
**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München im Klinikum Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann
und aus dem Institut für Molekulare Immunologie des Helmholtz Zentrums München
Institutsleiterin: Prof. Dr. Dolores Schendel**

**Zielgerichtete Inhibition des Akt-mTOR-
Signalweges unter Hitzeschock und Doxorubicin-
Behandlung in humanen Sarkomzellen *in vitro***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades in Humanbiologie an der Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Valentina Sujeva

aus Belikovo, Russland

München 2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Biochem. Rolf D. Issels

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Roland Dürr
Prof. Dr. Stefan Endres

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Elwira Strozyk

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsliste.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Tumorentstehung und Merkmale von Krebszellen.....	1
1.2 Sarkome	2
1.2.1 Ätiologie der Sarkome	3
1.2.2 Klassifizierung und Molekulargenetik von Sarkomen.....	4
1.3 Therapeutische Konzepte zur Behandlung von Sarkomen	6
1.3.1 Doxorubicin	7
1.3.2 Zielgerichtete Therapie	9
1.3.3 Klinische Anwendung der Hyperthermie.....	9
1.4 Thermaler Stress auf zellulärer Ebene	12
1.4.1 Subletale und letale Hitzeexposition	12
1.4.2 Antwort der Zelle auf thermalen Stress	13
1.4.3 Thermale Chemo- und Radiosensibilisierung	14
1.5 Der Pi3K-Akt-mTOR-Signaltransduktionsweg.....	15
1.5.1 Pi3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase.....	18
1.5.2 PTEN – Phosphatase und Tensin Homolog	18
1.5.3 Akt – Protein Kinase B	20
1.5.3.1 Aktivierung und Regulation von Akt.....	21
1.5.3.2 Akt-Substrate und deren physiologische Funktionen.....	22
1.5.3.3 Akt reguliert Zellwachstum, Zellzyklus und Proliferation.....	23
1.5.3.4 Akt als Inhibitor der Apoptose.....	24
1.5.3.5 Akt und Hitzeschockproteine	25
1.5.4 mTOR – <i>mammalian Target of Rapamycin</i>	26
1.5.5 Bedeutung des Pi3K-Akt-mTOR-Signalweges in der Tumorthherapie.....	27
1.6 Alkylphospholipide und deren antitumorale Wirkung.....	29
2. Ziel und Fragestellungen der Arbeit	34
3. Materialien und Methoden.....	36
3.1 Materialien	36
3.1.1 Zelllinien	36
3.1.2 Wachstumsmedien	36
3.1.3 Zellkulturreagentien	37
3.1.4 SDS-PAGE und Western Blot Reagentien	37
3.1.5 Antikörper	39
3.1.6 Lösungen zur Bestimmung der Vitalität und klonogenen Überleben der Zellen <i>in vitro</i>	40
3.1.7 Pharmakologische Substanzen zur Stimulation der Zellen.....	40
3.1.8 Adenovirale Vektoren für Akt- <i>Knock-Down</i> -Experimente	40

3.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	41
3.2 Methoden	41
3.2.1 <i>In vitro</i> Zellkulturen.....	41
3.2.3 Hitzeschock und Behandlung der Zellen	41
3.2.4 Bestimmung der Zellvitalität	42
3.2.5 Koloniebildungstest	42
3.2.6 Präparation von Zelllysaten	43
3.2.7 Elektrophoretische Proteinauftrennung und Western Blot.....	43
3.2.8 Immunochemischer Nachweis von Proteinen	44
3.2.9 Mikroskopie und Fotografie.....	44
3.2.10 siRNA-Experimente.....	44
3.2.10.1 Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi).....	44
3.2.10.2 Adenovirale siRNA-Transfektion	46
3.2.10.3 Das induzierbare shRNA-Expressionssystem.....	46
3.3 Statistik	47
4. Ergebnisse.....	48
4.1 Untersuchung des Akt-mTOR-Signalweges nach einem Hitzeschock bei 41,8°C	48
4.2 Analyse zum Einfluss von Perifosin auf die Akt-Phosphorylierung unter physiologischen und Hitzeschock-Bedingungen	52
4.3 Ermittlung der Hitzeempfindlichkeit von Zellen unter PTEN- <i>Knock-Down</i>	54
4.3.1 Die Vitalität von VSb9-Zellen unter PTEN- <i>Knock-Down</i> nach einer Perifosinbehandlung und Hitzeexposition	55
4.3.2 Das klonogene Überleben der VSb9-Zellen unter PTEN- <i>Knock-Down</i> nach einer Perifosinbehandlung und Hitzeexposition	57
4.4 Untersuchungen zum Einfluss von Perifosin auf die Vitalität und das klonogene Überleben von Sarkomzellen nach einem Hitzeschock.....	59
4.5 Untersuchungen zum Überleben von Sarkomzellen nach einer Doxorubicin-/Perifosinbehandlung in Kombination mit einem Hitzeschock.....	64
4.5.1 Analyse der Vitalität von Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen nach einer kombinierten Behandlung aus Doxorubicin, Perifosin und einem Hitzeschock.....	64
4.5.2 Analyse von Apoptose-Markern und morphologischen Veränderungen in Sarkomzellen nach einer Kombinationsbehandlung mit Perifosin, Doxorubicin und einem Hitzeschock	66
4.6 Der Einfluss von Perifosin auf die Sensitivität der Fibrosarkom HT1080-Zellen gegenüber Doxorubicin	71
4.6.1 Bestimmung der Zellvitalität nach einer kombinierten Behandlung aus Doxorubicin und Perifosin	71
4.6.2 Analyse der pro- und anti-apoptotischen Merkmale nach einer Behandlung von Fibrosarkom HT1080-Zellen mit Perifosin und Doxorubicin.....	73
4.7 Untersuchung zur physiologischen Rolle des Akt-Proteins in Liposarkom SW872-Zellen mittels RNA-Interferenz	76
4.7.1 Effizienz und Selektivität der unterdrückten Proteinsynthese von Akt-Isoformen.....	76

4.7.2 Der Effekt eines Akt- <i>Knock-Downs</i> und eines Hitzeschocks bei 41,8°C auf <i>downstream targets</i> von Akt.....	77
4.7.3 Auswirkungen eines Akt- <i>Knock-Downs</i> auf den Expressionslevel von Hitzeschockproteinen während eines Hitzeschocks in Liposarkom SW872-Zellen.....	80
4.7.4 Einfluss des Akt- <i>Knock-Downs</i> und eines Hitzeschocks bei 41,8°C auf GSK3 α/β sowie auf Erk1/2 und p38 MAP Kinasen	83
4.7.5 Untersuchungen zu apoptotischen Veränderungen in den Akt- <i>Knock-Down</i> -Zellen nach einem Hitzeschock und einer Perifosinbehandlung.....	86
5. Zusammenfassung der Ergebnisse	89
6. Diskussion	90
6.1 Ein Hitzeschock im Bereich von klinisch relevanten Temperaturen aktiviert den Akt-mTOR-Signalweg.....	90
6.2 Perifosin sensitiviert die Sarkomzellen gegenüber Hitzeschock und supprimiert das klonogene Überleben.....	94
6.3 Sensitivierung der Sarkomzellen gegenüber Doxorubicin durch die Behandlung mit Perifosin..	96
6.4 Auswirkungen eines Akt- <i>Knock-Downs</i> auf pro- und anti-apoptische Signalwege unter Hitzeschockbedingungen und Perifosin	100
7. Zusammenfassung.....	107
8. Literaturverzeichnis	109
9. Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsliste

μ	Mikro
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	<i>B cell lymphoma-2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
β-MeEtOH	<i>beta-Mercaptoethanol</i>
°C	Grad Celsius
Caspase	<i>Cystein-dependent aspartate-specific protease</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Doxo	Doxorubicin
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EWS	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FUS	<i>Fused in sarcoma</i>
g	Gramm
GSK3	Glycogensynthasekinase 3
GTP	Guanintriphosphat
HRP	Merrettich-Peroxidase
HSE	<i>Heat shock element</i>
HSF	<i>Heat shock factor</i>
HSP	Hitzeschockprotein
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
KD	<i>Knock-Down</i>
IKK	I kappa B Kinase
kDa	Kilodalton, relative Molekülmasse
Kontr	Kontrolle
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
M	mol/l
m	Milli
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
min	Minute
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>
Myc	<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
p53	Protein 53
p70/p85 S6K	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PDK-1	<i>3-phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
Perif	Perifosin
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PTEN	<i>Phosphatase with tensin homology</i>
Raf-1	<i>Rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
RHT	Regionale Hyperthermie
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>RNA-interference</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH2	<i>Scr-homology 2</i>
SHIP	<i>SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Src	Sarcoma
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylenediamid
Thr	Threonin
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
Tyr	Tyrosin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium</i>

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung und Merkmale von Krebszellen

Tumoren entstehen durch die unkontrollierte Vermehrung körpereigener Zellen. Aufgrund von Defekten in den Kontrollmechanismen des Zellwachstums und der Zellteilung können sich die Zellen autonom, d.h. unabhängig von übergeordneten Regulationssystemen des Organismus und progressiv, d.h. auch nach Beendigung des auslösenden externen Reizes, teilen. In der Regel entwickelt sich ein Tumor aus einer einzigen malignen veränderten Zelle, die einen Klon darstellt (Tumorstammzelle). Zur Malignität einer Zelle führt in erster Linie eine Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen in den Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen. Zu den Veränderungen werden Mutationen, Deletionen oder Multiplikationen, sowie chromosomale Translokationen gezählt, die zur Entstehung von Fusionsproteinen führen und somit die Regulation verschiedener zellulärer Signalwege beeinflussen können.

Nach ihren Eigenschaften und der Prognose unterscheidet man gutartige (benigne), bösartige (maligne) und semimaligne Tumoren, die eine Position zwischen den beiden Gruppen einnehmen. Bösartige Tumoren weisen in ihrer Biologie meist eine hohe Heterogenität auf, alle haben jedoch gemeinsame Merkmale (**Abb.1.1**): **1.** Toleranz gegenüber der permanenten Stimulation zur Proliferation; **2.** Die Fähigkeit, den Wachstumssuppressorsignalen zu entgehen; **3.** Resistenz gegen Apoptose; **4.** Nahezu unbegrenztes Reproduktionspotential und Resistenz gegen Zellalterung; **5.** Induktion der Angiogenese zur Neovaskularisierung des Tumorgewebes; **6.** Fähigkeit zur Invasion in andere Gewebe und Metastasierung (Thews, Mutschler, 1999; Ponder, 1992; Hanahan und Weinberg, 2011).

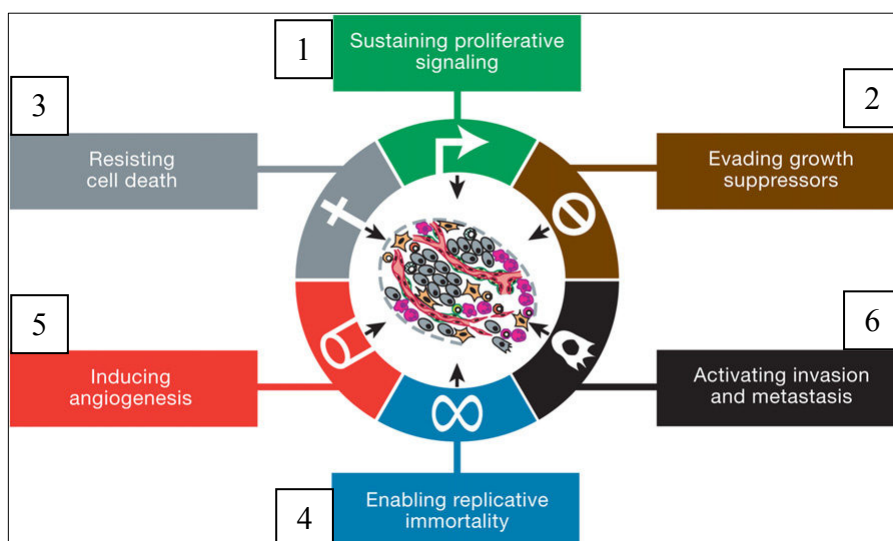


Abb.1.1 Schematische Illustration gemeinsamer Merkmale von Tumorzellen. Nach Hanahan und Weinberg, 2011, modifiziert.

Für die Krebsentstehung sind sowohl die oben genannten endogene als auch exogene Faktoren entscheidend. Exogene Faktoren wie Virusinfektionen, terrestrische Strahlung, Rauchen oder falsche Ernährung leisten dazu einen sehr bedeutenden Beitrag.

1.2 Sarkome

Sarkome repräsentieren eine relativ seltene heterogene Gruppe von Tumoren mesenchymalen Ursprungs (Matushansky et al., 2009). Weiträumig werden Sarkome in: **a)** Weichteilsarkome (*STS, soft tissue sarcoma*), **b)** Osteosarkome (*bone sarcoma*), **c)** Ewing-Sarkome und **d)** Chondrosarkome unterteilt (Fletcher, 2006).

Weichteilsarkome zeichnen sich durch ein hochinvasives Wachstum aus und metastasieren früh in ihrer Entwicklung. Die häufigsten Formen der Weichteilsarkome sind Liposarkome, Rhabdomyosarkome, Leiomyosarkome, Synovialsarkome und das Maligne Fibröse Histiocytem. Als Ursprungsgewebe dieser Tumoren gilt nicht-epitheliales, extraskellettale Gewebe (ca. 50% der Gewebemasse des Körpers) mit Ausnahme des retikuloendothelialen Systems und des Stützgewebes verschiedener parenchymatöser Organe. Die Gewebe werden durch Muskelgewebe, Fettgewebe, Bindegewebe, das periphere und autonome Nervengewebe und durch Blutgefäße

repräsentiert. Embryologisch handelt es sich um Abkömmlinge des Mesoderms und des Neuroektoderms.

Das Osteosarkom ist ein seltener, meist hochmaligner Tumor des Skelletsystems, dessen Zellen direkt Knochen oder Osteoid bilden. Der Primärtumor entsteht meist in der Metaphyse des Röhrenknochens, besonders in der Knieregion. Primär manifeste (10-20%) bzw. okkulte (ca. 80%) Metastasen sind in erster Linie in der Lunge lokalisiert, desweiteren auch häufig im Skelett. Osteosarkome kommen im Allgemeinen seltener vor als Weichteilsarkome, dafür aber häufiger bei Jugendlichen unter 20 Jahren (Matushansky et al., 2009, Helman, 2003; Grimer, 2010).

Sarkome werden nach der aktuellen WHO-Klassifikation in etwa 100 verschiedene Entitäten unterteilt. Diese unterscheiden sich nach ihrer histopathologischen Herkunft, den molekulargenetischen Veränderungen, ihrer Morphologie und ihrer Biologie. Die genaue Einordnung eines Sarkoms in die zutreffende diagnostische Gruppe hat eine Bedeutung für die Behandlungsstrategie und Prognose, da die einzelnen Entitäten ein unterschiedlich großes Risiko für das Auftreten von Rezidiven und Metastasen haben. Sarkome metastasieren überwiegend über die Blutbahn (Böcker, 2008).

1.2.1 Ätiologie der Sarkome

Die überwiegende Mehrheit der Sarkome entsteht sporadisch mit einer unbekannten Ätiologie. Jedoch wurden einige familiäre Dispositionen festgestellt und diverse Umweltfaktoren dokumentiert, die mit der Entstehung dieser Tumoren assoziiert sind. So wird die Entstehung mancher Sarkome im Zusammenhang mit zurückliegenden Verletzungen oder mit radioaktiver Exposition beschrieben. Sarkome werden verstärkt in der Nähe von Operations- oder Verbrennungsnarben (Keloide), an Stellen vorausgegangener Gewebe-Transplantation oder im Bestrahlungsareal einer früheren Strahlentherapie diagnostiziert (Helman, 2003).

1.2.2 Klassifizierung und Molekulargenetik von Sarkomen

Es wird zwischen Sarkomen mit und ohne histopathologischer Zuordnung unterschieden (**Tab. 1.1**). Die Klassifizierung von Sarkomen wird immer häufiger durch immunhistochemische und/oder molekularbiologische Methoden ergänzt. Die molekulare Klassifizierung der Sarkome basiert auf deren genetischen Veränderungen. Dementsprechend werden Sarkome in zwei Hauptgruppen unterteilt: **1)** Sarkome mit spezifischen genetischen Veränderungen, subklassifiziert in **1a)** Subgruppe mit Translokationen, die in onkogenetischen Fusionstranskripten resultieren, und **1b)** Subgruppe mit spezifischen onkogenetischen Mutationen; **2)** Sarkome mit multiplen, komplexen Aberrationen des Karyotyps ohne spezifischen Veränderungen des Genoms (Jain, 2010).

Tabelle 1.1 Histopathologische Zuordnung der Sarkome (Fletscher, 2002)

Sarkome mit histopathologischer Zuordnung	Sarkome ohne histopathologische Zuordnung
Liposarkom*	Synovialsarkom
Leiomyosarkom	Epitheloidsarkom
Fibrosarkom*	Alveoläres Weichgewebssarkom
Rhabdomyosarkom*	Klarzellsarkom
Angiosarkom/ Hämangiosarkome	Maligner primitiver neuroektodermaler Tumor
Maligner peripherer Nervenscheidentumor	Extraskellettales Ewingsarkom
Chondro-/Osteosarkom*	Desmoplastischer kleinzelliger Rundzelltumor
	Extrarenaler Rhabdoidtumor
	Undifferenzierte Sarkom

*Zelllinien dieser Entitäten wurden in der vorliegenden Arbeit experimentell untersucht

Nahezu die Hälfte aller Sarkome weist eine spezifische, relativ einfache genetische Läsion auf. Diese Translokationen resultieren in hochspezifischen Genfusions-transkripten, die meistens für chimäre Transkriptionsfaktoren kodieren. Das allgemeine Model für die Sarkom-assoziierte Translokation wurde wie folgt beschrieben: in den meisten Fällen kommt vom 5'-Ende ein starker Promotor sowie eine funktionale Domäne (z.B. EWS, FUS), während vom 3'-Ende eine DNA-

Bindedomäne bestimmt wird (z.B. FLI1, ERG, ATF1, DDIT3, WT1). In seltenen Fällen kodieren die Genfusionstranskripte für Wachstumsfaktoren oder Wachstumsrezeptoren. Es gibt Gruppen von Sarkomen, bei denen bestimmte Translokationen mit hoher Spezifität vorkommen. Die Fusionierung von EWS mit anderen Genen kann z.B. in Ewing-, Chondro- oder myxoider Liposarkom nachgewiesen werden (Antonescu, 2006). Ca. 90% der Synovialsarkome weisen die Translokation zwischen Chromosom X und Chromosom 18: t(X;18)(p11.2;q11.2) auf, dessen Fusionsprotein SYT-SSX unter anderem in der Regulation der EGFR- und Pi3K-Akt-Signalwege involviert ist (Teng et al., 2011).

Neben den für Sarkome spezifischen Translokationen kommen in einigen Weichteilsarkomen nicht selten Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen vor, wie beispielsweise der Funktionsverlust von PTEN (Saito et al., 2003). Eines der am detailliertesten charakterisierten Tumorsuppressorgene ist p53, dessen Überexpression in einer mutierten Form in 60% der Sarkome nachgewiesen wird (Helman et al., 2003). Amplifikationen vom Chromosom 1q beeinflussen die Expression von MDM2 und CDK4, was zu erheblichen Regulationsstörungen des Zellzyklus führt. Solche Amplifikationen wurden z.B. oft in Osteo- und Gliosarkomen identifiziert und scheinen einen erheblichen pathogenetischen Einfluss auf die Tumorentwicklung zu haben (Helman, 2003; Actor, 2002; Sakamoto 2008). Eine Zusammenstellung der Genmutationen, die in Weichteilsarkomen identifiziert wurden, ist in der **Tabelle 1.2** aufgeführt.

Zusätzlich zu Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen werden in Sarkomen auch Veränderungen verschiedener Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) beschrieben. Dysregulationen von etlichen RTK, wie EGFR, HER2R, PDGFR β , dem Stammzellfaktor Rezeptor c-KIT, dem Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor c-MET, sowie Mitgliedern der FGF-Rezeptor-Familie können das Tumorwachstum von Sarkomen induzieren. Die Aktivierung von RTK führt häufig zur Aktivierung des Pi3K-Akt-mTOR- und des MAPK-Signalweges, welche wiederum eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation und dem Zellüberleben spielen. Wichtig zu erwähnen ist, dass in diesen Signalwegen auch andere an der Signaltransduktion beteiligte Moleküle wie z.B. Pi3K, Akt, PTEN, mTOR, Raf und Ras Mutationen aufweisen können, die

ebenfalls zu einem unkontrollierten Tumorwachstum beitragen (Wan et al., 2007; Helman, 2003; Barretina et al., 2010; Friedrichs et al., 2011).

Tabelle 1.2 Mutationen in Weichteilsarkomen (Nach J. Barretina, 2010).

Sarkom-Subtyp	Gene	Vorkommen, %
pleomorphes Liposarkom	NF1	10,5
	PIK3CA	4,2
	RTK2B	4,2
	RB1	4,2
	SYK	4,2
	p53	16,7
	EPHA5	4,2
	EPHA4	4,2
dedifferenziertes Liposarkom	CDH1	2,0
	CTNNB1	2,0
	EPHA1	2,0
	FBXW7	2,0
myxoides Fibrosarkom	EPHA7	2,6
	ERBB4	2,6
	NF1	10,5
	NTRK1	2,6
	PI4KA	2,6
	PTEN	2,6
Synovialsarkom	CTNNB1	2,0
	LTK	4,0
	PI4KA	4,0
	PIK3CA	4,0
	PTEN	4,0
myxoides/rundzelliges Liposarkom	KIT	4,8
	PIK3CA	18

1.3 Therapeutische Konzepte zur Behandlung von Sarkomen

Abhängig von dem Subtyp, der Histopathologie und der Biologie einer Sarkomart muss eine abgestimmte Therapie angestrebt werden, um die Ansprechrate und damit die Überlebenschancen des Patienten zu steigern. Zu den Standardtherapien der Sarkome gehören operative Maßnahmen, Strahlentherapie und systemische Chemotherapie. Die Standardbehandlung besteht aus einer Resektion und bei

gegebenem Risikoprofil (Graduierung und Resektionsstatus) aus einer postoperativen Strahlentherapie. Die neo-adjuvante/adjuvante Chemotherapie ist für hochmaligne Sarkome bei entsprechender Tumorgroße ($>5\text{cm}$) und Graduierung ($G>1$) eine etablierte Behandlungsstrategie, mit der der klinische Verlauf verbessert werden kann. Eine neo-adjuvante, präoperative Chemotherapie kann die Tumorlast reduzieren. Die Chemotherapie allein reicht jedoch in den meisten Fällen nicht aus, um die Tumormanifestationen dauerhaft zu kontrollieren. Diese müssen operativ entfernt werden. Eine adjuvante, post-operative Chemotherapie kann durch die Wirkung auf verbliebene mikroskopische Tumorausläufer und Mikrometastasen die Rezidiventstehung verzögern oder verhindern. Die Anzahl chemotherapeutisch wirksamer Substanzen bei Weichteilsarkomen ist begrenzt. Die wichtigsten Chemotherapeutika sind Doxorubicin und Ifosfamid, von begrenzter oder Substituten-abhängiger Aktivität sind Trabectedin, Gemcitabin, Dacarbazin, Irinotecan und Temozolomid (Bokemeyer, 2006; Schöffski et al., 2011).

Die hochmalignen Osteosarkome bedürfen einer besonders komplexen multimodalen Therapie aus Chemotherapie und Operation. Als wirksamste Chemotherapeutika bei Osteosarkomen haben sich Doxorubicin und Methotrexat erwiesen. Die Addition von Cisplatin und Ifosfamid zu Doxorubicin und Methotrexat hat den klinischen Ablauf signifikant verbessert (Sakamoto, 2008). Eine Strahlentherapie ist bei Osteosarkomen nur begrenzt wirksam und wird daher nur eingesetzt, wenn mit dem operativen Verfahren keine lokale Sanierung zu erreichen ist (Bielack, 2010).

1.3.1 Doxorubicin

Doxorubicin, auch bezeichnet als Adriamycin, wurde 1969 aus dem Pilz-Stamm *Streptomyces peucetius* isoliert und als *14-Hydroxydaunorubicin* identifiziert. Das rotorange kristalline Pulver gehört zu den Tetrazyklin-Antibiotika, die ein planares Anthrachinon als Grundgerüst haben (**Abb.1.2**). Doxorubicin übt eine starke zytotoxische Wirkung aus. Daher wird es in der Medizin nicht aufgrund seiner antibiotischen Eigenschaft, sondern als Chemotherapeutikum in der Krebsbehandlung eingesetzt. Überwiegend wird Doxorubicin zur Behandlung von soliden Tumoren wie Osteosarkomen, Weichteilsarkomen, Neuroblastomen, Ovarial-, Mamma- und

Blasenkarzinomen, aber auch bei akuten Leukämien und bei Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt (Henke, 1993).

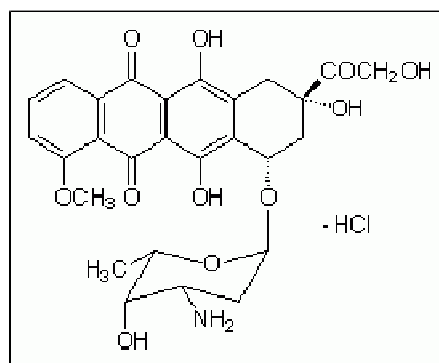


Abb.1.2 Strukturformel von Doxorubicin-Hydrochlorid $M_m = 579,98 \text{ g/mol}^{-1}$ (Merck-Chemicals)

Der Wirkmechanismus von Doxorubicin beruht auf einer Einlagerung (Interkalation) zwischen den Basenpaaren der DNA-Doppelhelix. Durch die nicht-kovalente Bindung von Doxorubicin an die DNA wird die Anbindung des Enzyms Topoisomerase II gehemmt, welches für die DNA-Entfaltung während der Replikation und Transkription der Erbsubstanz mitverantwortlich ist. Durch Doxorubicin wird dieser Prozess gehemmt und somit auch die Transkription und die anschließende Proteinsynthese. Dadurch führt die Doxorubicin-DNA Interaktion zu einer Störung vieler Zellfunktionen und schließlich zur Hemmung der Zellteilung. Da Doxorubicin hauptsächlich den Zellzyklus stört, wirkt es überwiegend auf schnell proliferierende Zellen (Hande, 1998).

Als weitere zytotoxische Wirkmechanismen werden Veränderungen der Zellmembranfunktionen, Chelatbildung mit Metallionen sowie Bildung freier DNA-schädigender Radikale angenommen. Außer den tumorhemmenden Eigenschaften besitzt Doxorubicin mutagene, teratogene und auch karzinogene Wirkungen (Lyu et al., 2007).

1.3.2 Zielgerichtete Therapie

Im Rahmen von präklinischer und klinischer Studien versucht die biomedizinische Forschung die Therapiekonzepte zur Sarkombehandlung zunehmend durch multimodale Strategien zu verbessern. Zum einen werden neue Adjuvantien und neue Substanzen, die bei anderen Tumorarten zytostatische Wirkung aufwiesen, erprobt. Zum anderen werden weitere Therapieansätze wie z.B. zielgerichtete Wirkstoffe untersucht, um die Behandlung von Sarkomen bestmöglichst zu optimieren. So wurde beispielsweise die Inhibition von RTK (z.B. Imatinib[®]), VEGF (z.B. Bevacizumab[®]), mTORC1 (z.B. RAD001, AP23573), Akt (Perifosin[®]) in einigen Studien als Monotherapeutika oder in Kombination mit Standardtherapeutika (z.B. Doxorubicin) eingesetzt (Wan et al., 2007; Balasubramanian et al., 2006; Lessnik et al., 2011; Bailey et al., 2006).

Aus diesem Grund wird als Teil dieser Arbeit die Effizienz des therapeutischen Potenzials des Akt-Inhibitors Perifosin in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin an Sarkomzellen untersucht.

1.3.3 Klinische Anwendung der Hyperthermie

Ein vielversprechendes Therapiekonzept für die Behandlung von Sarkomen ist die Anwendung der Hyperthermie als Zusatztherapie zur Chemo- und/oder Radiotherapie. Eine bereits etablierte und nicht-invasive Anwendungsform der Hyperthermie basiert auf einer lokalen Einstrahlung elektromagnetischer Wellen, welche als Regionale Hyperthermie (RHT) bezeichnet wird. Sie dient einer kontrollierten Erhöhung der Temperatur im Tumorgewebe und im unmittelbar angrenzenden Gewebebereich, auch „Tumorbett“ genannt. Im klinischen Einsatz der RHT lassen sich in Kombination mit der standardisierten systemischen Chemotherapie ohne schwerwiegende Nebenwirkungen Temperaturen von 40-43°C in tiefliegenden Tumoren der Extremitäten, des Körperstamms und im Becken-/Abdomenbereich mit entsprechenden Ringapplikatoren erreichen (**Abb.1.3**) (Issels, 2008).

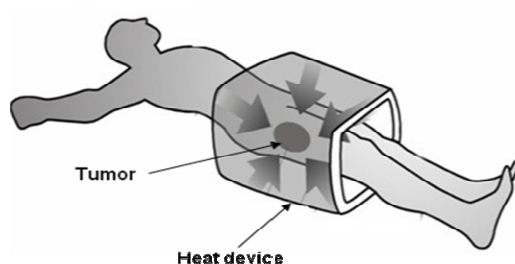


Abb. 1.3 Ringapplikator zur regionalen Hyperthermie (RHT) des Abdomens und Beckens.

Die thermale Dosis, die während einer therapeutischen Stunde auf den Tumor wirkt, hat auf die Krebszellen geringe direkte zytotoxische Auswirkungen. Die Effektivität der RHT kann an der unorganisierten Struktur der Blutgefäße des Tumorgewebes liegen. Die chaotische Vaskularisierung im Tumorgewebe führt zur Entstehung von Hypoxie und einem niedrigen pH-Wert besonders in Arealen mit niedriger Perfusionsrate. In den gering perfundierten Tumorealen, die eher Chemo- und Strahlentherapie resistent sind, kommt es unter der Hyperthermie-Behandlung zu einer verbesserten Perfusion und damit zu einer vermehrten Zytostatikaanflutung bzw. besseren radiosensibilisierenden Oxygenierung. In Kombination der Hyperthermie mit einer systemischen Chemotherapie und/oder Radiotherapie wurden darüber hinaus verstärkende bzw. synergistische Effekte auf die Zytotoxizität nachgewiesen. Die Anwendung der Hyperthermie mit systemischer Chemotherapie in Standarddosierung erfolgt meist simultan während der Zytostatikainfusion, wobei die Zeitdauer 1-2 Stunden beträgt (Schlemmer, 2004).

Einen wichtigen Beleg für die Wirksamkeit des lokoregionalen Hyperthermieverfahrens stellt der nachgewiesene Zusammenhang zwischen der applizierten thermischen Dosis und dem klinischen Ansprechen im Sinne einer lokalen Tumorkontrolle dar (Hildebrandt, 2004). Als präoperatives Verfahren kann Hyperthermie in Kombination mit einer adjuvanten Chemo- oder Strahlentherapie durch eine Reduktion der Tumormasse eine Resektion ermöglichen, die sonst aufgrund der räumlichen Nähe des Tumors zu empfindlichen Körperstrukturen undurchführbar wäre (Lindner, 2011).

Klinische randomisierte prospektive Phase III Studien an 314 Patienten mit lokal begrenzten fortgeschrittenen Weichteilsarkomen haben erwiesen, dass durch eine neo-adjuvante Chemotherapie in Kombination mit RHT ein klinisches Benefiz erreicht werden kann. Bei dieser Langzeitstudie wurde die Chemotherapie (Etoposid, Ifosfamid und Doxorubicin - EIA) allein oder in Kombination mit RHT angewandt. Die EIA in Kombination mit RHT führte zu einer signifikanten Verbesserung des Tumoransprechens, einer Verhinderung vorzeitiger Progression, einer Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens und des gesamten Überlebens im Vergleich zu einer adjuvanten alleinigen Chemotherapie (**Abb.1.4**) (Issels et al., 2010).

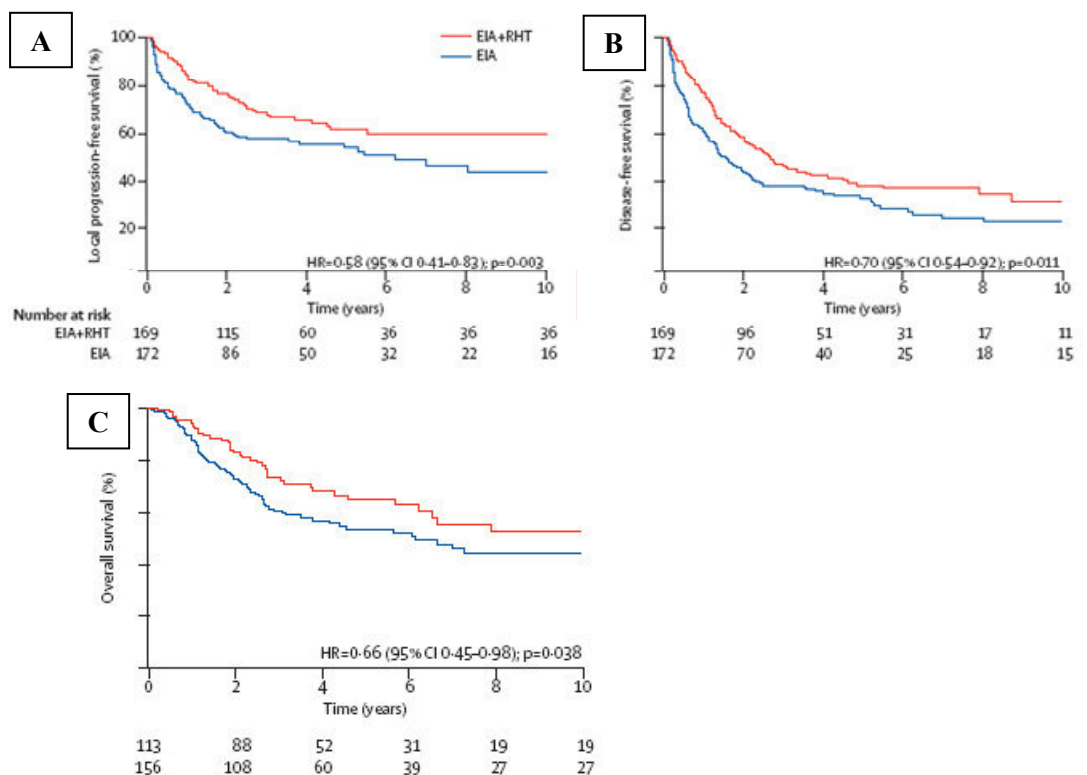


Abb.1.4 Kaplan-Meier Kurven von lokal progressionsfreiem Überleben (A), krankheitsfreiem Überleben (B) und Gesamtüberleben bei Patienten, die eine vollständige neo-adjuvante Induktionstherapie erhalten haben (C) (Issels, 2010).

1.4 Thermaler Stress auf zellulärer Ebene

1.4.1 Subletale und letale Hitzeexposition

Die Letalität von Krebszellen infolge eines Hitzeschocks ist von der Dauer der Hitzeexposition und der Temperatur abhängig. Die Sterberate der humanen Zellen erhöht sich exponentiell als Funktion der Expositionsdauer und steigender Temperatur, was als direktes *Dosis-Wirkungs-Verhältnis* bezeichnet wird. Wichtig ist, dass die thermale Induktion des Zelltodes bei Temperaturen 42°C-43°C wesentlich geringer als bei Temperaturen >43°C ist. Dies ist abhängig von einem Übergang in die Hitzeresistenz-Phase, welche durch eine Entstehung von „Schultern“ (oder sog. „breakpoints“) in einer Überlebenskurve veranschaulicht wird (**Abb.1.5**) (Fuller et al., 1994; Hildebrandt, 2002). Das Absterben der Zellen hängt wesentlich von Zelltyp ab und läuft über zwei Mechanismen ab. An CHO-Zellen beispielsweise wurde gezeigt, dass durch die Exposition von einer Stunde bei 42°C Apoptose induziert wird. Aufgrund der Temperaturerhöhung, der Expositionsdauer oder beider zusammen kommt es zur Nekrose (Fuller et al., 1994).

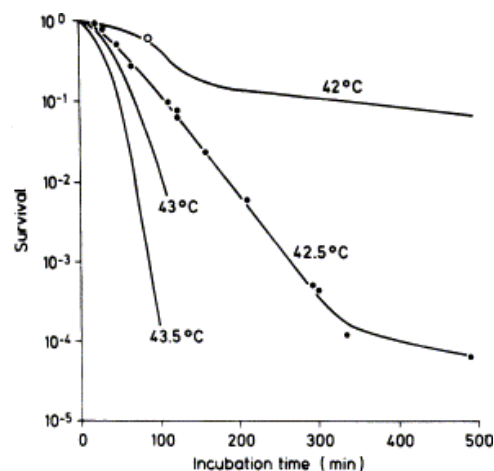


Abb.1.5 *Dosis-Wirkungs-Verhältnis* des klonogenen Überlebens der Zellen nach einem Hitzeschock. Schematische Darstellung der Überlebensrate der verschiedenen eingesetzten Temperaturen bei CHO-Zellen (Hildebrandt, 2002).

1.4.2 Antwort der Zelle auf thermalen Stress

Als eine der ersten Antworten der Zelle auf einen Hitzeschock wurde die Induktion von Hitzeschockproteinen (HSPs) beschrieben. HSPs werden auch als „Stress Proteine“ bezeichnet, da deren Expression auch unter Einwirkung von vielen weiteren Stressfaktoren wie z.B. oxidativem Stress, Schwermetallen oder bei Entzündungsreaktionen induziert wird. Die Gruppe von HSPs umfasst mehrere Familien von Proteinen die nach ihrer Größe und ihrer Wirkungsweise kategorisiert werden: kleine HSP (> 40 kDa), HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100. Eine der wichtigsten Aufgaben der HSPs ist deren Chaperon-Funktion. Dies umfasst den Schutz der Proteine vor Denaturierung, in dem sie reversibel an deren hydrophobe Sequenzen binden. Dabei zeigen einige HSPs einen ATP-abhängigen Reaktionszyklus (Polier et al., 2008). Die HSP-Expression wird wenige Minuten nach dem jeweiligen Stress durch die schnelle Aktivierung des HSFs (*heat shock factor*) induziert. Die Aktivierung des HSFs hängt von seiner Trimerisierung und einer effizienten Translokation in den Zellkern ab, wo er an das HSE (*heat shock element*) der Promotorregion der *hsp*-Gene bindet und deren Transkription initiiert. Das HSE beinhaltet eine hochkonservierte Sequenz (5'-nGAAn-3'), die in der Promotorregion aller durch Hitzeschock induzierten Gene gefunden wird (Fuller et al., 1994; Jolly et al., 2000; Hildebrandt, 2002).

Eine besondere Bedeutung für die Hyperthermie hat die hitzebedingte Induktion von HSP70. Dieses Protein wird unter normalen physiologischen Bedingungen nur bei einigen Tumorarten, aber bei keinem gesunden Gewebe an der Zelloberfläche exprimiert. Dort kann es als Erkennungsstruktur für NK-Zellen (*natural killer cells*) fungieren. Die Expression von HSP70 wird sowohl in der intrazellulären als auch in der Oberflächen-assoziierten Fraktion durch Hyperthermie weitgehend verstärkt. Die im hyperthermierten Tumor nachgewiesene lokale Nekrose führt zur Freisetzung von HSP70 und HSP70/Peptidkomplexen. Diese werden von dendritischen Zellen aufgenommen und prozessiert. Die HSP-gebundenen Peptide werden anschließend T-Zellen präsentiert, was zur Induktion einer spezifischen Immunantwort führt. Somit wird postuliert, dass die durch Hyperthermie induzierten HSPs zu einer

erstrebenswerten antitumoralen Immunität beitragen (Milani, et al., 2005; Jolesch et al., 2011).

Zu den weiteren Effekten der Hyperthermie gehört die Änderung der Stabilität und Fluidität der zellulären Membranen, was *in vitro* zu Störungen in der Funktionalität von Transmembran-Rezeptoren und dem transmembranen Proteintransport führt. Die Steigerung der Fluidität der Membran wurde interessanterweise bei thermosensitiven Zellen beobachtet aber nicht bei thermotoleranten Zellen (Hildebrandt, 2002). Ein Hitzeschock induziert die Aggregation und Denaturierung der Cytoplasma-, Membran- und Kernproteine. Dieser Effekt ist abhängig vom Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt und führt zur Störung vieler molekularer Funktionen, wie der DNA-Synthese und der DNA-Reparaturmechanismen. Es wurde demonstriert, dass die Hyperthermie eine Reihe von Wechselwirkungen in der Organisation des Zytoskeletts verursacht. Allerdings wurde bis jetzt keine klare Korrelation zwischen diesem Phänomen und der Thermoempfindlichkeit der Zellen festgestellt. Die Anwendung von höheren Temperaturen ($>42^{\circ}\text{C}$) bringt eine direkte schädigende Wirkung auf die RNA-, DNA- und Proteinsynthese, wobei sich die RNA- und Proteinsynthese nach dem Hitzeschock relativ schnell regenerieren. Die DNA-Synthese bleibt hingegen für eine lange Zeit nach der Hitzeexposition unterdrückt (Hildebrandt, 2002).

1.4.3 Thermale Chemo- und Radiosensibilisierung

Von besonderer klinischer Relevanz sind die verstärkenden Effekte der Hyperthermie auf die Strahlen- und Chemotherapie. Zurzeit ist die Hyperthermie als das wirksamste radiosensibilisierende Verfahren bekannt. Das Ausmaß des Synergismus durch Hyperthermie und einer Bestrahlung ist abhängig von der applizierten Temperatur, dem Zeitintervall zwischen Hyperthermie und Bestrahlung und der Behandlungssequenz (Hildebrandt, 2002). Wesentliche Gründe für die Wirkungsverstärkung der Strahlentherapie scheinen die durch eine gesteigerte Gewebepfusion hervorgerufene Verbesserung der Gewebeoxygenierung (indirekter Effekt), sowie eine Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen (direkter Effekt) auf zellulärer Ebene zu sein (Schlemmer et al., 2004). Die neusten Ergebnisse zeigen, dass während Hyperthermie im Bereich von $41-42,5^{\circ}\text{C}$ Schlüsselproteine der DNA-

Reparaturmechanismen, wie z.B. BRCA2 (*BR*east *C*ancer 2) degradieren, wodurch die homologe Rekombination während der DNA-Reparatur verhindert wird (Krawczyk, et al., 2011). Außerdem wurde gezeigt, dass es eine temperaturabhängige Inhibition von der DNA-Polymerase- α und - β , die in der Basenexzisionsreparatur involviert sind gibt. Aus diesen Gründen können die durch die Bestrahlung- oder Chemotherapie-induzierten DNA-Schäden nicht repariert werden (Raaphorst et al., 2004; Hildebrandt, 2002).

Die „thermale Chemosensibilisierung“ bei Temperaturen zwischen 40,5°C und 43°C ist allerdings von den eingesetzten chemotherapeutischen Substanzen abhängig. Bei alkylierenden Substanzen und Zytostatika, die direkt mit der DNA wechselwirken, zeigt sich ein verstärkender zytostatischer Effekt wie z.B. bei Cyclophosphamid, Ifosfamid und Platin-haltigen Chemotherapeutika. Für Anthracycline wie z.B. Doxorubicin ist die Erhöhung der thermalen Sensibilisierung dagegen relativ gering. Eine erhöhte intrazelluläre Wirkstoffaufnahme, eine gesteigerte DNA-Schädigung sowie eine durch die verbesserte Gewebeperfusion erhöhte intratumorale Wirkstoffkonzentration sind wichtige Faktoren für die Chemosensibilisierung während der hyperthermischen Behandlung (Issels, 2008).

Hitze ist einer der Stressfaktoren, der im Wesentlichen auch die Regulation weiterer intrazellulärer Signalkaskaden mitsteuern kann. Welche molekularen Mechanismen durch den Hitzeschock reguliert werden und inwiefern die hitzeassoziierte intrazelluläre Änderungen die Vitalität und Chemosensitivität der Tumorzellen beeinflussen, ist größtenteils unerforscht.

1.5 Der Pi3K-Akt-mTOR-Signaltransduktionsweg

Durch intensive Forschungsarbeiten der Molekulargenetik im onkologischen Feld wurde gezeigt, dass der Pi3K-Akt-mTOR-Signalweg (**Abb. 1.6**) einer der am häufigsten dysregulierten Signalwege in der Onkogenese ist und zur Entstehung sowie Progression verschiedener Tumorarten, auch von Sarkomen beiträgt (Scheid und Woodgett, 2001; Hernando et al., 2007; Dobashi et al., 2009). Die Hyperaktivierung dieses Signalweges führt zu unkontrolliertem Zellwachstum, Proliferation, Zellzyklusprogression, Zellüberleben, Proteinsynthese sowie zu einem verstärkten

Metabolismus. Außerdem tragen Dysregulierungen in der Signalkaskade zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapien bei und korrelieren oft mit einer schlechten Prognose für die Krebspatienten (Knuefermann et al., 2003; Liang et al., 2003).

Demzufolge spielt der Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Therapierbarkeit und Überlebensrate von Tumorpatienten. Aus diesem Grund beschäftigen sich viele Wissenschaftler verschiedener Disziplinen mit der Erforschung dieses Signalweges, um therapeutische Konzepte zu verbessern und die Überlebenschancen der Patienten zu erhöhen.

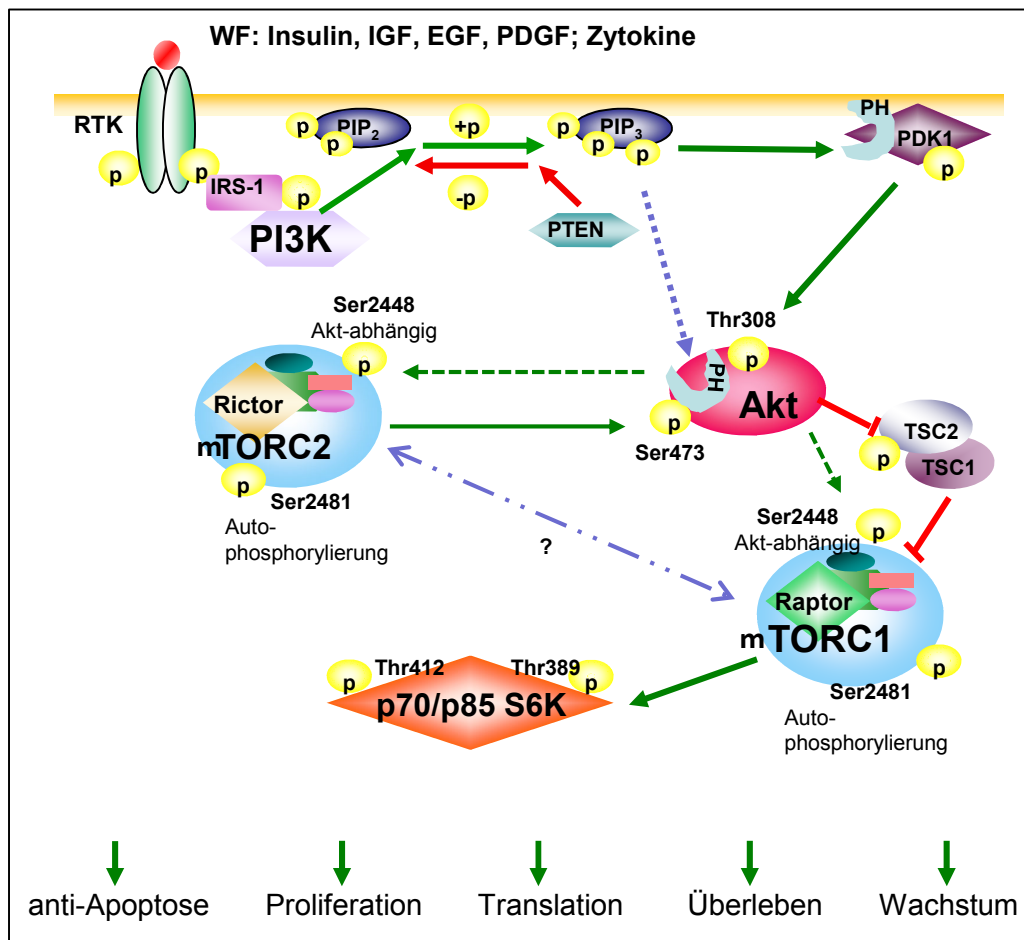


Abb. 1.6 Schematische Darstellung des PI3K-Akt-mTOR-Signalweges und seiner Funktionen. Durch Wachstumsfaktoren (WF) oder Zytokine stimulierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) rekrutieren und aktivieren die Lipidkinase PI3K, die den PIP_3 generiert. PIP_3 bindet an Proteine, die eine PH-Domäne besitzen (PDK1, Akt). Diese Reaktion löst die Konformationsänderung von Akt aus, was die Phosphorylierung am Thr308 durch die PDK1 und somit dessen partielle Aktivierung ermöglicht. Die Phosphorylierung am Ser473 durch mTORC2 bewirkt eine vollständige Aktivierung von Akt. Aktiviertes Akt vermittelt die Phosphorylierung von mTOR (Ser2448) und als Folge die Aktivierung von p70/p85 S6K, welche das ribosomale Proteins S6 phosphoryliert. Dies führt zur Translation, Proliferation, Überleben und Wachstum der Zelle. Desweiteren bewirkt das aktivierte Akt eine Hemmung apoptotischer Prozesse und unterstützt auf diesem Weg ebenfalls das Zellüberleben. Negativ reguliert wird der PI3K-Akt-Signalweg durch den Tumorsuppressor PTEN, der PIP_3 zu PIP_2 dephosphoryliert. Nach Bhaskar und Hay, 2007; Chalhoub und Baker, 2009, modifiziert.

1.5.1 Pi3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (Pi3K) sind eine evolutionär hochkonservierte Familie intrazellulärer Lipidkinasen, die das 3'-Hydroxylende von Phosphatidylinositol und Phosphoinositiden phosphorylieren. Die Pi3-Kinasen werden in drei Klassen (IA, IB, II und III) entsprechend ihrem Substrat, ihrem Bindungspartner, ihrer Aktivierung und der Sequenzhomologie unterteilt. Pi3-Kinasen der Klasse-I sind am meisten in verschiedenen Organismen erforscht und detailliert beschrieben. Durch die Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine an die transmembranen RTK wird die Autophosphorylierung der zytosolischen Domäne der Rezeptoren an den Thyrosin-Resten ausgelöst. Dies führt anschließend zur direkten oder indirekten (durch Adapterproteine) Phosphorylierung und dadurch zur Aktivierung von Pi3K-IA, während die Aktivierung der Pi3K-IB durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) stimuliert wird (Engelman, 2006). Durch die enzymatische Aktivität der Pi3K-Klasse-I wird das an die Plasmamembran gebundene Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PiP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PiP₃) phosphoryliert. PiP₃ ist ein in der Zelle verbreiteter *lipid second messenger*, der regulatorische Funktionen in vielen Mechanismen der Signaltransduktion einnimmt. Die Interaktion zwischen PiP₃ und der Pleckstrin-homologen-Domäne (PH-Domäne) von zahlreichen Proteinen – meistens Kinasen wie Akt, PDK1, PKC – führt zur deren Rekrutierung zur Plasmamembran und anschließenden Aktivierung (Lemmon und Ferguson, 2000; Vanhaesebroek et al., 2001; Engelman et al., 2006).

1.5.2 PTEN – *phosphatase and tensin homolog*

PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten*) wurde als erstes Tumorsuppressorgen in einem breiten Spektrum von Tumortypen identifiziert (Li et al., 1997; Steck et al., 1997). PTEN ist eine dualspezifische Lipid- und Proteinphosphatase, die Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste dephosphoryliert (Myers et al., 1997). Die Hauptfunktion von PTEN besteht jedoch in dessen Funktion als 3'-Hydroxyl-Lipidphosphatase bei der Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PiP₃) zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PiP₂) (**Abb. 1.7**). Somit ist PTEN der Gegenspieler der Pi3K. Zusammen mit SHIP (*SH2 domain*

containing inositol 5'-phosphatase) ist PTEN der negative Regulator des Pi3K-Akt-mTOR-Signalweges und wirkt den proliferations- und wachstumsfördernden Stimulationen entgegen. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Deletionen, Mutationen oder post-translationale Dysregulationen von PTEN zur Hyperaktivierung des Pi3K-Akt-mTOR-Signalwegs führen. Dementsprechend ist PTEN ein wichtiger negativer Hauptregulator dieses Signalweges (Zhang und Yu, 2010).

Die Regulation von PTEN ist sehr komplex und findet sowohl auf transkriptioneller, post-transkriptioneller als auch auf post-translationaler Ebene statt. Bei diesen Prozessen sind viele Moleküle unterschiedlicher Signalwegen beteiligt (Vasudevan et al., 2004, Han et al., 2008, Kim et al., 2004; 2007; Kwon et al., 2004; Ross et al., 2007; Downes et al., 2007). Wichtig ist, dass die Phosphorylierung an der C-terminalen Region von PTEN durch Casein Kinase-2 (CK-2) in seinen inaktiven Zustand überführt, während eine Dephosphorylierung seine Translokation zur Zellmembran erlaubt, an der PTEN dem Pi3K-Akt-mTOR-Signalweg entgegenwirkt (Wang et al., 2008).

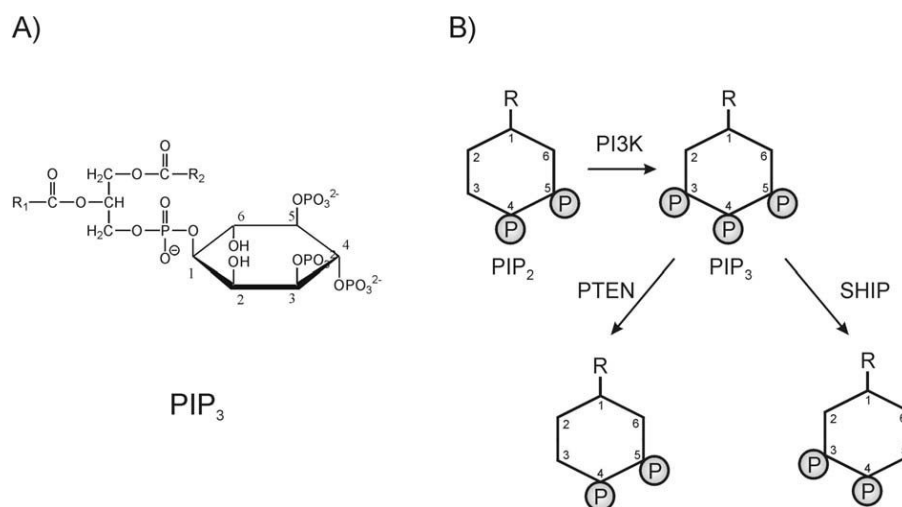


Abb. 1.7 Bildung und Abbau von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) A) Strukturformel von PIP₃; B) Phosphorylierung von PIP₂ durch die Phosphoinositid 3'-Kinase und Dephosphorylierung von PIP₃ durch die Phosphatasen PTEN (am 3'-Ende) und SHIP (am 5'-Ende). Nach Zhang und Yu, 2010.

Eine Dysregulation einer oder mehrerer Wege, die die PTEN-Aktivität unterdrücken, führt unmittelbar zu einer Anreicherung von PiP_3 in den Zellen und zur Hyperaktivierung von Akt, das zahlreiche Überlebenswege in der Zelle steuert. Die Folge dieser Hochregulation ist eine mögliche Begünstigung der Krebsentstehung und der Krebsprogression (Simpson, et al., 2001).

1.5.3 Akt – Protein Kinase B

Die Serin/Threonin Proteinkinase B (PKB, auch bekannt als Akt, 60 kDa) gehört zur Familie der AGC-Proteinkinasen (*PKA*-, *PKG*-, *PKC* - like Family) (Hergovich, 2006). In Säugerzellen existieren drei Isoformen $\text{PKB}\alpha/\text{Akt1}$, $\text{PKB}\beta/\text{Akt2}$ und $\text{PKB}\gamma/\text{Akt3}$, die von drei separaten Genen kodiert werden. Die Isoformen sind hochkonserviert und haben eine hohe Sequenzhomologie (>80%). Jede der Isoformen beinhaltet eine Pleckstrin-homologe Domäne (PH) am N-Terminus, eine katalytische Domäne (KD) und eine regulatorische Domäne (RD) mit dem sogenannten *hydrophobic motif* am C-Terminus (**Abb. 1.8**) (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000).

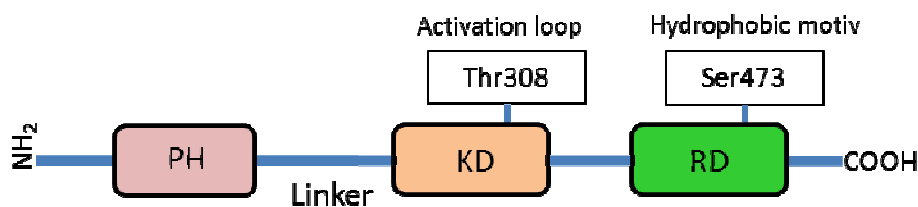


Abb. 1.8 Schematische Darstellung der Akt-Domänen. Pleckstrin-homologe Domäne (PH), die mit PiP_3 interagiert; Katalytische Domäne (KD) mit einer Phosphorylierungsstelle am Thr308; Regulatorische Domäne (RD), die ein hydrophobes Motiv (HM) besitzt und am Ser473 phosphoryliert wird, und als Andockstelle für andere Proteine dient. Nach Vanhaesebroeck and Alessi, 2000, modifiziert.

1.5.3.1 Aktivierung und Regulation von Akt

Die Aktivierung von Akt läuft in mehreren Schritten ab. Die Stimulation von Transmembran-Rezeptoren wie RTK führt zur Aktivierung der Pi3-Kinase. Das dabei generierte PiP_3 interagieren mit der PH-Domäne von Akt (**Abb.1.9**). Diese Interaktion ist ein entscheidender Schritt für die Aktivierung von Akt, der eine Konformationsänderung verursacht (Woodgett, 2005; Bozulic und Hemmings, 2009). Nachdem Akt zur Plasmamembran rekrutiert wurde, befindet es sich in der räumliche Nähe zu der Kinase PDK1 (*phosphoinositide-dependend kinase-1*) und mTORC2 (*mammalian target of rapamycin, complex-2*). Die regulatorische Domäne beinhaltet ein *hydrophobic motif* (HM), welches als allosterischer Modulator das Andocken zu PDK1 und die anschließende Phosphorylierung des Thr308 an der katalytischen Domäne vermittelt. Diese Phosphorylierung führt nur zu einer partiellen Aktivierung der Kinase (Stokoe et al., 1997; Stephens et al., 1998). Das Ser473 an der regulatorischen Domäne wird von mTORC2 phosphoryliert (Sarbasov, 2005). Zur vollen kinetischen Aktivität von Akt ist die Phosphorylierung beider Domänen erforderlich (Franke, 2008). Es sind noch weitere Phosphorylierungsstellen bei Akt bekannt, deren Bedeutung jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt wurde. Den Vermutungen nach tragen diese zur Stabilisierung des Proteins und seiner Aktivität bei. So begünstigt z.B. die Phosphorylierung am Ser129 durch die CK2 (*casein kinase 2*) die Phosphorylierung von Thr308 durch die PDK1, steigert die katalytische Aktivität und schützt gegen die Dephosphorylierung durch die Thr308-Phosphatase PP2A (Maira et al., 2009).

Die Deaktivierung von Akt erfolgt durch die Dephosphorylierung der beiden Phosphatgruppen von Ser473 und Thr308. Die Proteinphosphatase 2A (PP2A), die dementsprechend eine Tumorsuppressorfunktion hat, dephosphoryliert Thr308 am *activation loop* der katalytischen Domäne (Sato et al., 2000), während die Phosphatgruppe vom Ser473 an der regulatorischen Domäne von PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) eliminiert wird (**Abb. 1.9**) (Brognard et al., 2007; Gao et al., 2005).

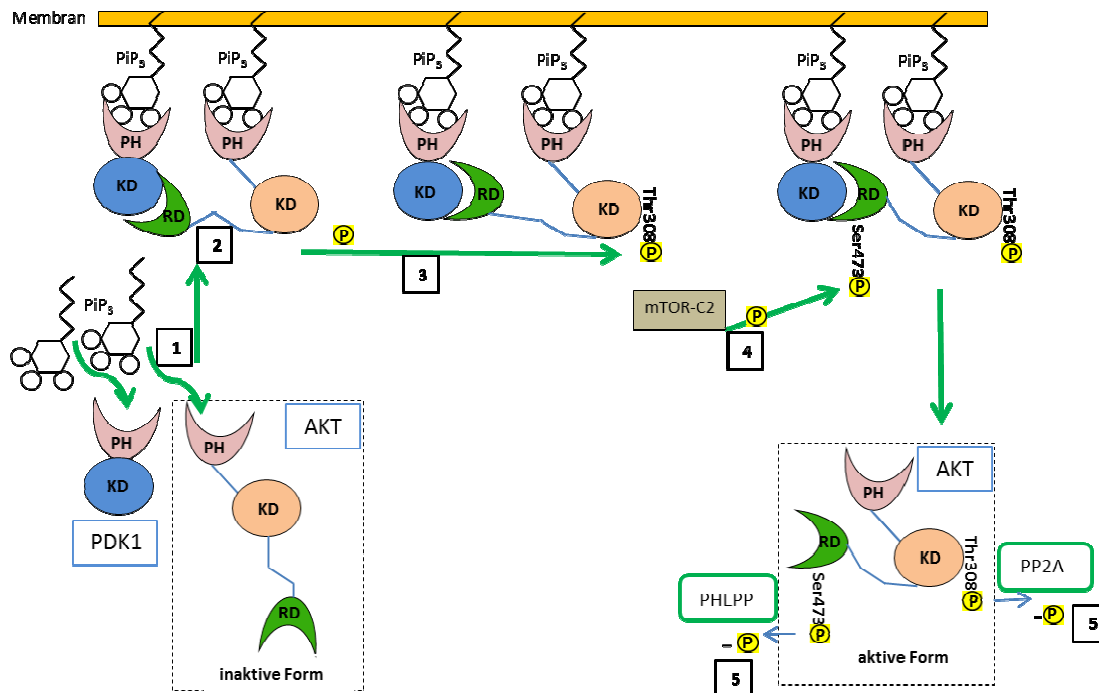


Abb. 1.9 Regulationsprozess von Akt. 1. PI₃ interagiert mit der PH-Domäne von Akt und PDK1, 2. Translokation der beiden Kinasen zur Plasmamembran, begleitet von der Konformationsänderung von Akt, 3. die aktivierte PDK1 phosphoryliert Akt am Thr308 an der katalytischen Domäne (KD), 4. mTORC2 phosphoryliert die regulatorische Domäne am Ser473, 5. die aktive Form von Akt wird durch Phosphatasen deaktiviert. PP2A entfernt die Phosphogruppe am Thr308, und die PHLPP am Ser473. Nach Woodgett, 2005 und Brognard, 2007 modifiziert.

1.5.3.2 Akt-Substrate und deren physiologische Funktionen

Es wurden ca. 100 Substrate (Zielproteine) identifiziert, die durch Akt phosphoryliert werden (Manning und Cantley, 2007). Die optimale Konsensus-Sequenz der Zielproteine für die Serin/Threonin-Protein Kinase B ist Arg-X-Arg-X-X-Ser/Thr (Obata et al., 2000). Die Akt-Zielproteine sind in zahlreiche biologische Funktionen der Zellphysiologie involviert, wie Proliferation, Zellzyklus, Zellwachstum, Metabolismus, Apoptose inhibierende und antiapoptotische Signalwege (**Abb. 1.10**) (Franke, 2008; Manning und Cantley, 2007). Eines der ersten entdeckten Substrate von Akt war die Glykogensynthasekinase-3 α und β (GSK3 α/β), die desweiteren eine Vielzahl der im Zellmetabolismus involvierten Prozesse reguliert (Cross et al., 1995). Diese Kinase wird als Antwort auf eine Insulinstimulation von Akt phosphoryliert (GSK3 α -Ser21 und GSK3-Ser21) und dadurch deaktiviert. Das bekannteste Substrat von GSK3 ist dabei

die namensgebende Glykogensynthase, die die Glykogensynthese stimuliert. Somit führt die durch Akt vermittelte Inaktivierung von GSK3 zu einer Steigerung der Glykogensynthese und Glykolyse (**Abb. 1.10**) (Manning und Cantley, 2007).

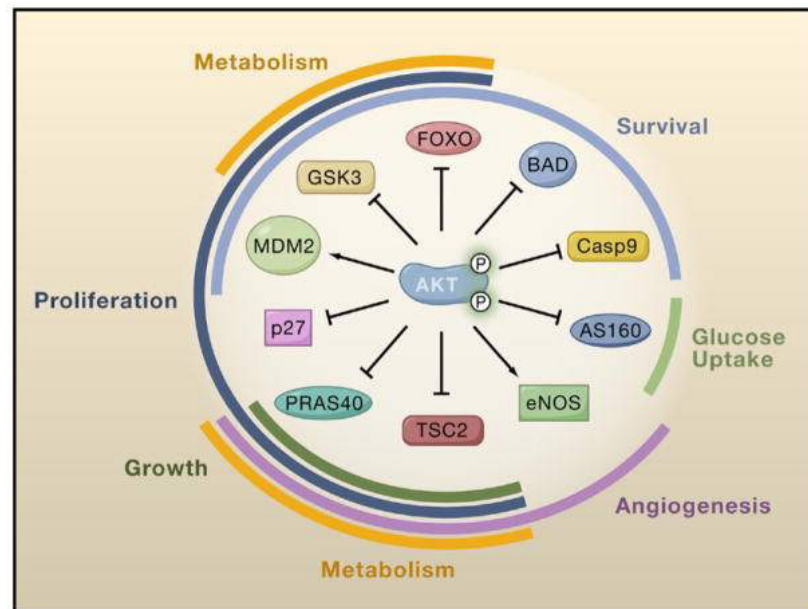


Abb. 1.10 Zelluläre Funktionen der Hauptsubstrate von Akt. Die Akt-vermittelte Phosphorylierung der Zielproteine führt zu deren Aktivierung oder Inhibierung. Diese sind in viele regulatorische Mechanismen involviert wie Zellüberleben, Zellwachstum, Proliferation, Proteinsynthese, Glukoseaufnahme, metabolische Prozesse und Angiogenese (Manning und Cantley, 2007).

1.5.3.3 Akt reguliert Zellwachstum, Zellzyklus und Proliferation

Akt-abhängige Mechanismen, bei denen Zellwachstum, Zellzyklus und Proliferation reguliert werden, wurden sehr detailliert untersucht. Eines der Schlüsselproteine für die Zellzyklusregulation ist $p21^{\text{Cip1/WAF1}}$, der Hauptinhibitor der CDK (*cyclin dependent kinase*). Die Akt-vermittelte Phosphorylierung von $p21^{\text{Cip1/WAF1}}$ am Thr145 verhindert seine Translokation in den Zellkern und somit sein Potential den Zellzyklus zu unterbinden. Die Funktion von $p27^{\text{Kip1}}$, eines weiteren Inhibitors des Zellzyklus, wird auf ähnliche Weise durch eine Akt-vermittelte Phosphorylierung am Thr157 reguliert. Die Inhibierung führt ebenfalls zur Verhinderung seiner Translokation in den Zellkern, was in der Aktivierung der CDK resultiert (Liang et al., 2002; Shin et al., 2002; Viglietto et

al., 2002). Diese beiden Zellzyklus-Inhibitoren p21^{Cip1/WAF1} und p27^{Kip1} zeigen in Tumorzellen häufig Dysregulationen (Coqueret, 2003).

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Interaktion zwischen dem Pi3K-Akt-mTOR-Signalweg und dem Tumorsuppressor p53. Die E3-Ligase MDM2 (*murine double minute 2*, oder HDM2 *human double minute 2*) ubiquitiniert p53 und induziert somit seine Degradation. Es wurde berichtet, dass eine Pi3K-Akt-abhängige Aktivierung der MDM2-Ligase stattfindet. Es ist aber nicht gezeigt worden, dass Akt die direkte Kinase von MDM2 ist (Hanada, 2004; Franke, 2008). Experimentell wurde gezeigt, dass PTEN direkt an p53 bindet und somit seine Aktivität steigert. Zusammenfassend lässt sich also schlussfolgern, dass bei einer Hyperaktivierung des Pi3K-Akt-mTOR-Signalweges die Aktivität von p53 blockiert und somit das Tumorwachstum gefördert wird (Freeman et al., 2003).

Ein weiteres Protein, das im Zellzyklus eine große Rolle spielt und Akt-abhängig reguliert wird ist Cyclin D1. Es wird von der GSK3 β , die inhibitorisch von Akt reguliert wird, am Thr286 phosphoryliert, was zu seiner Translokation aus dem Zellkern ins Cytoplasma führt. Dort wird es anschließend abgebaut und somit wird Cyclin D1 durch die Inhibierung der GSK3 β über Akt stabilisiert (Diehl et al., 1998). Die GSK3 β phosphoryliert ebenfalls den Transkriptionsfaktor c-Myc am Thr58, wodurch der prototypische Abbau von c-Myc induziert wird. Diese Phosphorylierung kann durch die Akt-abhängige Deaktivierung der GSK3 β aufgehoben werden, was dann zu einer Stabilisierung von c-Myc führt (Sears et al., 2000).

Akt repräsentiert auch einen kritischen Regulator der Translation und der ribosomalen Biogenese, der als Antwort auf Nahrung und Wachstumsfaktoren via mTORC1 die Prozesse steuert.

Auf diese Weise reguliert Akt verschiedene Schritte im Zellzyklus und Zellwachstum.

1.5.3.4 Akt als Inhibitor der Apoptose

Der kontrollierte Zelltod, bezeichnet als Apoptose, wird durch ein Zusammenspiel von pro- und anti-apoptotischen Molekülen auf verschiedenen Ebenen streng reguliert. Akt fördert über verschiedene direkte und indirekte Mechanismen das Zellüberleben und wirkt somit der Apoptose entgegen. BAD (*BCL-2-antagonist of death*), ein Mitglied

der Bcl-2-Familie, bildet einen Komplex mit Bcl-2/Bcl-X (Familie der IAP, *inhibitors of apoptosis proteins*), um deren antiapoptotische Wirkung zu verhindern. Akt phosphoryliert BAD am Ser136 und inhibiert das proapoptotische BAD, indem es die Dissoziation des mitochondrialen Bcl-2/Bcl-X/BAD-Komplexes initiiert (Datta et al., 1997). Eine durch Akt vermittelte Stabilisierung eines anderen Mitglieds der IAP-Familie Mcl-1 (*Myeloid cell leukemia/lymphoma 1*) erfolgt sowohl durch eine direkte inhibitorische Phosphorylierung von GSK3 β als auch auf transkriptioneller Ebene durch eine Phosphorylierung und Aktivierung von CREB (*cAMP response element-binding protein*) (Parcellier et al., 2008). Außerdem verhindert Akt durch die Phosphorylierung von FoxO (*forkhead transcription factor*), dass diese in den Zellkern importiert werden. Dadurch kann die Transkription der FoxO-Zielgene, zu denen die proapoptotischen Proteine Bim, Noxa und der Fas-Ligand gehören, nicht initiiert werden (Brunet et al., 1999, Dijkers et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass Akt direkt die Caspase-9 am Ser196 phosphoryliert und deren Proteaseaktivität und somit die proapoptotische Wirkung verringert (Cardone et al., 1998). Durch Phosphorylierung von I κ B-Kinase (IKK) werden der antiapoptotisch wirkende Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor of κ B*) und seine Zielgene, wie Bcl-XL, cIAP1 und cIAP2 (Mitglieder der IAP-Familie), durch Akt reguliert (Romashkova und Makarov, 1999). Somit gewährt Akt zahlreiche Resistenzmechanismen gegen Apoptose und fördert das Überleben der Zelle.

1.5.3.5 Akt und Hitzeschockproteine

Durch Koimmunoprecipitations-Experimente wurde demonstriert, dass HSP27 mit Akt und der p38 MAP-Kinase Komplexe bildet (Mearow et al., 2002). In einer weiteren Arbeit wurde festgestellt, dass die Phosphorylierung von HSP27 am Ser82 durch Akt zur Dissoziation dieses Komplexes führt. Das phosphorylierte HSP27 interagiert nachfolgend mit weiteren Proteinen, die entweder die Aktivität der antiapoptotischen Proteine steigern oder andererseits die der proapoptotischen verringern. Beispielsweise führt die Interaktionen von phospho-HSP27 mit Caspase-3, Caspase-9 und Cytochrom *c* zur Unterdrückung der Apoptoseinduktion. Es wurde auch gezeigt, dass die HSP27-Akt-Interaktion für die Kinaseaktivität von Akt notwendig ist. Durch Stresssituationen

wie einen Hitzeschock wird die Assoziation des HSP27-Akt-Komplexes verstärkt (Rane et al., 2003).

Zwischen dem Akt-Signalweg und HSP70 besteht ebenso ein enges Zusammenspiel. Wie HSP27, ist auch HSP70 an der Stabilisierung der Akt-Kinase beteiligt. Andererseits ist die Expression von HSP70 vom Pi3K-Akt-Signalweg abhängig. An Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass die HSP70-Expression durch Akt reguliert wird und die Überexpression von Akt wiederum zur einer höheren Anreicherung von HSP70 führt (Ying Qu et al., 2009). Die GSK3 β , die inhibitorisch von Akt reguliert wird, phosphoryliert HSF1 am Ser303 und verhindert seine Translokation in den Zellkern, wo HSF1 die HSP70-Expression initiiert (Mustafi et al., 2010). Der intrazelluläre Akt-Level wird auch von der konstitutiv exprimierten Form der HSC70 (*heat shock cognate protein 70*) beeinflusst (Powers et al., 2008).

Ein weiteres Chaperon, HSP90, das in zahlreiche physiologische Prozesse involviert ist, trägt zum Zellüberleben bei (Clark et al., 2009). HSP90 ist notwendig für die Aktivierung und Stabilität von Akt. Auf ähnliche Weise wie HSP27 und HSP70 bildet HSP90 einen Komplex und zwar sowohl mit Akt als auch mit PDK1. Infolge einer Dissoziation dieses Komplexes oder einer Inhibition der ATPase-Aktivität von HSP90 kann die Initiation der Apoptose eingeleitet werden (Basso et al., 2002; Sato et al., 2000).

1.5.4 mTOR – *mammalian Target of Rapamycin*

Ein weiteres Schlüsselprotein im Pi3K-Signalweg ist mTOR (*mammalian target of rapamycin*), ein 289 kDa großes Enzym, das aufgrund seiner hohen Sequenzhomologie in der COOH-terminalen katalytischen Domäne zur Familie der Pi3-Kinasen gehört. Im Unterschied zu den Pi3-Kinasen ist mTOR ausschließlich eine Proteinkinase, die Serin- und Threoninreste phosphoryliert (Memmott und Dennis, 2009). In Säugerzellen liegt mTOR in einem Proteinkomplex vor, von dem entsprechend der Zusammensetzung der Ko-Proteine und Substrate zwei Varianten existieren: mTOR-Komplex1 (mTORC1) und mTOR-Komplex2 (mTORC2). mTORC1 besteht aus mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40, FKBP38 und Deptor und ist sensitiv gegenüber Rapamycin und seinen Derivaten. Die Komponenten von mTORC2 sind mTOR, Rictor, mLST8, SIN1, Protor und Deptor (**Abb. 1.6**). Die Komplexe werden

unterschiedlich durch Rapamycin moduliert, wobei mTORC1 inhibiert wird. mTORC2 dagegen bleibt relativ resistent. Nur bei einer langen Behandlung mit hohen Konzentrationen von Rapamycin kann die Inhibierung und anschließende Dissoziation des gesamten mTORC2 Komplexes erreicht werden (Dunlop und Tee, 2009). mTORC1 vermittelt die Translation als Antwort auf Nahrung und Wachstumsfaktoren. Akt spielt dabei eine wichtige regulatorische Rolle. Es wurde gezeigt, dass Ser2448 von mTOR ein direktes Zielprotein von Akt ist und diese Phosphorylierung oft mit der mTORC1-Aktivierung korreliert (Sekulić et al., 2000). Zusätzlich werden zelluläre mTORC1-Inhibitoren wie PRAS40 und der Tumorsuppressor TSC2 von Akt phosphoryliert und inhibiert (Manning und Cantley, 2007; Inoki et al., 2002). Infolge dessen phosphoryliert aktives mTORC1 die in der Regulation der Translation involvierten Proteine wie z.B. die p70/p85 S6-Kinasen und 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) (Ma und Blenis, 2009). Zusätzlich inhibiert der mTORC1 Autophagie und Apoptose (Cazzolara et al., 2009) und ist durch die Phosphorylierung von Cyclin D1 in die Zellzyklusregulation involviert (Mamane et al., 2006). mTORC2 phosphoryliert die PKC α und ε (Huang und Manning, 2009), sowie Akt am Ser473 und trägt somit zu dessen voller Aktivierung bei (Sarbasov et al., 2005). mTORC2 spielt eine Rolle in der Reorganisation des Zytoskellts, indem es die Aktinpolymerisation kontrolliert (Jacinto et al., 2004).

Die Regulation der beiden Komplexe ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es sind mehrere Phosphorylierungsstellen bekannt, die in der Regulation, Komplexbildung und katalytischen Aktivität des Enzyms eine Rolle spielen. Es hat sich auch gezeigt, dass zwei Phosphorylierungen nämlich am Ser2448 (Akt-abhängige Regulation, Sekulic et al., 2000) und am Ser2481 (Autophosphorylierung, Soliman et al., 2010) eine wichtige Bedeutung in der mTOR-Regulation haben.

1.5.5 Bedeutung des Pi3K-Akt-mTOR-Signalweges in der Tumorthherapie

Die Anwendung von molekularen, zielgerichteten Therapeutika gegen Pi3K und dessen *downstream targets* zeigte sowohl in Tiermodellen als auch im klinischen Einsatz Erfolge (Neri et al., 2003 West et al., 2002; Price et al., 1996). So konnte das therapeutische Potential von Gemcitabin in der Behandlung des Pankreaskarzinoms

bei gleichzeitiger Inhibierung der Pi3K erhöht werden, indem die apoptotische Wirkung des Gemcitabins verstärkt wurde (Ng et al., 2000). Die Inhibition dieses Signalweges sensibilisiert auch Ovarialkarzinomzellen gegenüber Cis- und Carboplatin, was mit der Inhibierung einer DNA-Bruchassoziierten, Pi3K-Akt-vermittelten antiapoptotischen Phosphorylierung von BAD in Verbindung gebracht wird (Hayakawa et al., 2000; Westfall et al., 2005).

Tumorprogression und Chemoresistenz ist in vielen Krebsarten mit einem erhöhten Phosphorylierungsstatus von Akt assoziiert, wie z.B. in Gehirntumoren (Sonoda et al., 2001), Endometriumkarzinomen (Gagnon et al., 2004), Brust-, Lungen-, Leber-, Magen- und Darmkrebs (Knuefermann et al., 2006; Moore, et al., 1998; Ueda et al., 2006; Bae et al., 2006), Ovarial- und Prostatakarzinomen (Yuan et al., 2000; Carson et al., 2001), Leiomyosarkomen, malignen fibrösen Histozytomen und dedifferenzierten Liposarkomen (Hernando et al., 2007). Akt kann auf verschiedene Wege zum Onkogen werden. Eine Ursache dafür ist die permanente Stimulation des Signalweges mit Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Zytokinen. Mutationen, Fusionen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder die Hyperaktivierung des Insulinrezeptors (IR oder IGFR) stellen in Sarkomen eine häufige Ursache der permanenten Akt-Aktivierung dar (Scotlandi und Picci, 2008; Helman und Meltzer, 2003). Eine konstitutive Aktivierung der Pi3K durch den EGFR wurde in manchen Leukämien dokumentiert (Moscatello et al., 1998). Darüber hinaus wurden somatische Mutationen, Genamplifikationen, Genüberexpression der Pi3K-Untereinheiten oder Deregulationen der Ras-vermittelten Aktivierung von Pi3K wurden oft in vielen verschiedenen Tumorarten festgestellt. Am meisten jedoch wurde ein Funktionsverlust durch Mutationen, Gendeletion oder post-translationaler Inaktivierung von PTEN beschrieben, was zur permanenten Hyperaktivierung von Akt führt (Engelman, 2006). Einige Deregulationen von Akt wie Genamplifikation, Genüberexpression und Mutationen der PH-Domäne, die für die Akt-Aktivierung eine entscheidende Rolle spielt, wurden in verschiedenen Krebsarten bereits identifiziert (Davies et al., 2008; Steelman, 2011; Carpten et al., 2007).

Neue Erkenntnisse zeigen, dass unter den pathologischen Bedingungen der intratumoralen Hypoxie (Warburg-Effekt) die Expression von HIF1 (*hypoxia inducible factor 1*) induziert wird. HIF1 ist ein Transkriptionsfaktor zur Adaptation an Hypoxie,

der Überlebenswege in der Zelle aktiviert. Bei diesem Prozess werden auch die Onkogene wie Myc, Ras und Akt hochreguliert (Pez et al., 2011).

Da der Pi3K-Akt-mTOR-Signalweg auch viele Funktionen wie Remodulierung des Zytoskeletts (Hooshmand-Rad et al., 1997), Zellmotilität und Polarisation steuert (Keely et al., 1997), verleiht er der Tumorzelle die Fähigkeit zur Migration und Invasion. Diese zählen zu wichtigen Prozessen bei der Bildung von Metastasen (Arcaro und Guerreiro, 2007). Akt übernimmt eine wichtige Funktion in der Induktion der Invasion von Tumorzellen durch die Produktionssteigerung der Metalloproteinase-9 (Kim et al., 2001) und durch die Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors und des β -Catenin-Signalweges (Sliva et al., 2002; Agarwal et al., 2005). Somit spielt Akt eine kritische Rolle in der Regulation von vielen onkogenetischen und prometastatischen Prozessen in der Zelle (List et al., 2005).

Die vielfältige Wechselwirkung zwischen Akt und den HSPs, die im Tumorgewebe oft überexprimiert werden (Qu et al., 2009; Zhang und Burrows, 2004), stellt somit ein passendes *Target* in der Krebstherapie dar. Stoffe mit einer inhibitorischen Wirkung gegen Hitzeschockproteine werden in klinischen Studien bereits getestet (Ciocca und Calderwood, 2005; Stingl et al., 2010; Hadchity et al., 2009).

Infolge dieser Erkenntnisse sind die Entwicklung und der Einsatz zielgerichteter Therapeutika gerechtfertigt. Allerdings bedarf es genauer molekularer Untersuchungen um die Patientengruppen zu identifizieren, die von einer zielgerichteten Therapie profitieren könnten. Ziel ist es nach Möglichkeit individuelle Therapien zu entwickeln, die zuverlässig zur individuellen Tumorbekämpfung führen, ohne zahlreichen toxischen Nebenwirkungen hervorzurufen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Akt-mTOR-Signalweges sollen ein Beitrag zur Entwicklung und Optimierung von Tumorentherapien leisten.

1.6 Alkylphospholipide und deren antitumorale Wirkung

Alkylphospholipide (APLs) – z.B. Edelfosin, Miltefosin, Erufosin und Perifosin – sind synthetische, nicht in der Natur vorkommende Lipide mit speziellen antitumoralen Eigenschaften. Charakteristisch für APLs ist die polare Kopfgruppe und die lange Alkylkette, die die Inkorporation in die Lipiddoppelschicht zellulärer Membranen

ermöglicht. Diese Eigenschaft ist unter anderem für die pharmakologische Wirksamkeit der APLs verantwortlich. APLs wirken auf schnell proliferierende, metabolisch hochaktive Zellen wie Krebszellen, aber kaum auf normale gesunde Zellen (Blitterswijk, 2008). Auf Grund dieser biologischen Eigenschaft ist deren Anwendung in der Tumorthherapie hochinteressant. Im Gegensatz zu den klassischen Standard-Chemotherapeutika zeichnen sich APLs allgemein dadurch aus, dass sie ihre Wirkung in der Zelle ohne eine direkte Interaktion mit der DNA entfalten (Nosedo et al., 1989). Die APLs beeinflussen die Permeabilität und Fluidität von Membranen. Sie interferieren mit Phospholipiden, die in Signaltransduktionskaskaden involviert sind und wirken dadurch als molekulare *Target*-Inhibitoren. Bei diesen Vorgängen werden wichtige Prozesse in der Zelle beeinflusst, wie Zellproliferation, Zellzyklusprogression, Differenzierung und Angiogenese (Jendrossek, 2003; Ruiter et al., 2001). APLs scheinen die zytotoxischen Effekte der „klassischen“ Krebstherapien, wie etwa der Strahlentherapie zu verstärken, indem sie mit verschiedenen spezifischen Signalwegen in Wechselwirkung treten (Ruiter et al., 1999).

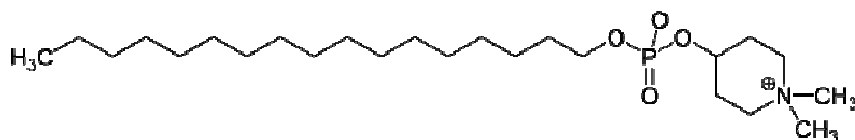


Abb. 1.11 Chemische Struktur von Perifosin (Blitterswijk, 2008).

Aus der klinischen Perspektive ist Perifosin (**Abb. 1.11**) als selektiver Akt-Inhibitor das am weitesten entwickelte Alkylphospholipid und ist als oral bioverfügbares Alkylphospholipid in klinischen Studien zugelassen (Granville, 2006). Zur Zeit befindet sich Perifosin in klinischen Phase II Studien in der Erst-, Zweit- oder Drittlinientherapie bei verschiedenen Krebserkrankungen, wie z.B. Prostatakarzinomen, Kopfhals-Tumoren, Brustkrebs, Pankreaskarzinomen, malignen Melanomen, AML und Sarkomen (Chiarini et al., 2008; Kondapaka et al., 2003; Argiris et al., 2006; Bailey et al., 2006; Ernst et al., 2005; Knowling et al., 2006; Leighl et al., 2007; Marsh Rde et al., 2007; Posadas et al., 2005). Perifosin wurde in 23 Patienten mit Weichteilsarkom in einer Phase II Studie als Monotherapeutikum eingesetzt und bei einigen Patienten konnten klinische Erfolge erzielt werden (Bailey et al., 2006). In einer bei SARC-2007 präsentierten klinischen

Studie bei Patienten mit Weichteilsarkom zeigte sich eine hohe Ansprechrate, resultierend in einer sechs- bis mehr als 18-monatiger Lebensverlängerung. Interessanterweise waren viele von diesen Patienten an Sarkomen erkrankt, die Multiresistenzen bei der Chemotherapie aufwiesen (Steinert et. al., 2007).

Um die antiproliferative und proapoptotische Wirkung von Perifosin zu erklären, wurden mehrere Wirkmechanismen postuliert. Einerseits wird Perifosin, wie alle Alkylphospholipide mit dem lipophilen Ende in die Lipiddoppelschicht der Membran eingelagert und beeinflusst somit lipidabhängige zelluläre Signalwege. Andererseits ist Perifosin ein spezifischer reversibler Inhibitor von Akt (Patel et al., 2002; Gills und Dennis, 2009). Im Unterschied zu den meisten Kinase-Inhibitoren, die mit der ATP-bindenden Region der entsprechenden Kinase wechselwirken, interagiert der polare Kopf von Perifosin mit der Pleckstrin-homologen Domäne (PH-Domäne) von Akt (Kondapaka, 2003). Die Struktur des polaren Kopfes von Perifosin ermöglicht die stereochemische Anpassung an die PH-Domäne von Akt, wodurch die Bindung von PIP_3 an die PH-Domäne verhindert wird, und somit die Phosphorylierung von Akt (**Abb.1.12**). Die Phosphorylierung ist für die enzymatische Aktivität von Akt notwendig (Sarbasov, 2005). Wenn diese Aktivierung aber nicht stattfinden kann, ist der Pi3K -Akt-mTOR-Signalweg blockiert und die Signalweiterleitung *downstream* von Akt wird unterbrochen. In den meisten Studien zeigt Perifosin eine effektive anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung. Eine besonders effektive apoptotische Wirkung zeigt sich in den Zellen, die sich durch eine hohe Proliferationsrate kennzeichnen (Fu et al., 2009).

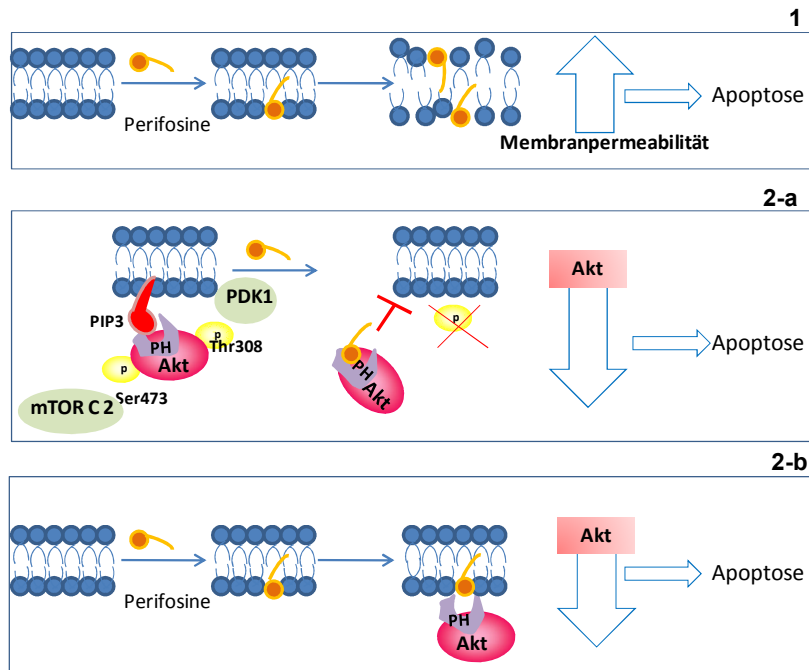


Abb. 1.12 Schematische Darstellung der postulierten Wirkmechanismen von Perifosin:
1. durch die Anlagerung von Perifosin in die Lipiddoppelschicht der Membran wird diese destabilisiert, was zur Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran führt (Van der Luit, 2002, 2007); **2-a, 2-b.** durch die stereochemische Interaktion des polaren Kopfes von Perifosin mit der PH-Domäne von Akt wird die Interaktion mit PIP₃ und eine nachfolgende Akt-Phosphorylierung verhindert (näheres siehe Text) (Nach Gills und Dennis, 2009).

Einige Arbeiten demonstrieren, dass unter Einfluss von Perifosin die Phosphorylierung verschiedene Kinasen hochreguliert werden, wie z.B. c-Jun-NH2-Kinase (JNK) und p38-MAP Kinase, die in der Aktivierung der Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Li, 2006; Chiarini, 2008). Die Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass die ERK 1/2 MAP Kinasen, die ähnlich wie Akt in Überlebens- und Proliferationswege involviert sind, unter einer Perifosinbehandlung aktiviert werden (Nyåkern, 2006, Hideshima T, 2007). Dieser Effekt ist nicht durch eine direkte Modulation durch Perifosin zu erklären, sondern indirekt aufgrund einer kompensatorischen Aktivität der Kinasen, die durch das Fehlen von Akt aktiviert werden. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass Akt der negative Regulator von Raf-1 ist, dessen Aktivität die Hochregulation von ERK 1/2 über MEK steuert (Steelmann, 2004; Rommel, 1999). Hauptsächlich wird bei der Behandlung mit Perifosin jedoch der Pi3K-Akt-mTOR Signalweg in den Tumorzellen durch die Inhibierung von Akt moduliert. (Blitterswijk, 2008, Lei Fu et al., 2009). Da Akt auch durch die negative Regulation von

GSK-3 α und -3 β in die Regulation des Zellmetabolismus involviert ist, werden durch die Perifosinbehandlung Akt-abhängige metabolische Regulationsprozesse stark beeinflusst, was zu einer Energiedepletion und zur anschließenden Initiierung der Apoptose beitragen kann. Eine durch die Perifosinbehandlung induzierte Apoptose wurde anhand der Aktivierung von Initiator Caspase-9, Effektor-Caspase-3 und -Caspase-7 an verschiedenen Krebszelllinien gezeigt. Nach der Caspasenaktivierung wird Poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP, Substrat der Caspase-3) fragmentiert. PARP ist in die Reparaturmechanismen der DNA involviert und somit ist die PARP-Fragmentierung ein Zeichen für eine fortgeschrittene Apoptose (Fei, 2010; Kumar, 2009; Li, 2010).

Es besteht eine enge Korrelation zwischen der initialen Aktivierung des Pi3K/Akt Signalweges und der Wirkungseffektivität von Perifosin in Krebszellen. Die Krebszellen, die Anomalien im Pi3K-Akt-mTOR-Signalweg aufzeigen, reagieren besonders empfindlich bezüglich deren Überlebens auf Perifosin oder andere Inhibitoren dieses Signalweges (Hennessy, 2007).

In dieser Arbeit soll Perifosin als ein effektiver Akt-Inhibitor angewandt werden, um die Bedeutung des Akt-mTOR-Signalweges unter hyperthermischen Bedingungen und/oder in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin zu untersuchen.

2. Ziel und Fragestellungen der Arbeit

Die Hyperthermie als Zusatztherapie zur Chemo- und/oder Radiotherapie bei bestimmten Tumorentitäten verbessert den klinischen Verlauf der Patienten. Für das Verständnis der molekularbiologischen Vorgänge im hyperthermierten Tumorgewebe bzw. den malignen Tumorzellen gibt es offene Fragen, insbesondere im Hinblick auf die Beeinflussung der verschiedenen bekannten Signalwege. Der Akt-mTOR-Signaltransduktionsweg als einer der aktuellen Kernpunkte onkologischer Forschung könnte auch im Bereich der Hyperthermie eine Rolle spielen. In Tumorzellen ist dieser Signalweg oft konstitutiv aktiviert, was eine schnelle Proliferation und die Expansion der Zellen gewährleistet und auch zur Entwicklung von Chemoresistenzen beiträgt. Bekannterweise kann die Aktivierung durch Stress ausgelöst werden. Es gibt jedoch bislang keine Untersuchungen, ob/wie dieser Signalweg durch Hyperthermie oder durch eine Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie beeinflusst wird.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen des Akt-mTOR-Signalweges unter Hitzeschock *in vitro* zu analysieren und auch die Kombination von Hitzeschock und zytostatisch wirksamen Substanzen (Beispiel Doxorubicin) zu untersuchen.

Dazu ergaben sich die im Folgenden gestellten Fragen:

1. Hat ein Hitzeschock bei klinisch relevanten Temperaturen einen Einfluss auf die Regulation des Akt-mTOR-Signalweges in Tumorzellen?
2. Wie hoch ist die Hitzeempfindlichkeit von Zellen, die eine hohe intrinsische Aktivität des Akt-mTOR-Signalweges aufweisen?
3. Hat der Akt-Inhibitor Perifosin einen Einfluss auf das Überleben der Sarkomzellen? Inwieweit wird die Vitalität der mit Hitzeschock behandelten Sarkomzellen durch Perifosin beeinträchtigt?

4. Wird die Wirkung von Doxorubicin bei zeitgleicher Inhibition von Akt in Sarkomzellen verändert? Welche Auswirkung hat eine derartige Kombinationsbehandlung auf Sarkomzellen unter einem Hitzeschock?
5. Wie beeinflusst die Regulation des Akt-mTOR-Signalweges die nachgeschalteten intrazellulären Signalwege, wie die MAP Kinase-Kaskade, die Induktion der Synthese von Hitzeschockproteinen oder auch die Induktion von Apoptose?

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 3.1 Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit untersucht:

Zelllinie	Gewebe	Organismus	Wachstums medium	Verdopplungs zeit	Bezugsquelle
SW872	Liposarkom	Human	1	≈48h	CLS*
MG63	Osteosarkom	Human	1	≈24h	CLS*
A673	Rhabdomyosarkom	Human	1	≈24h	CLS*
HT1080	Fibrosarkom	Human	2	≈36h	CLS*
FG	Pankreaskarzinom	Human	3	≈16h	Lab. Prof. Bruns Klinikum Großhadern
VSb9 (IDG3.2)	Embryonale Stammzellen	Maus	4	≈8h	IDG, Helmholtz Zentrum München

*CLS – Cell Line Service, Eppelheim

3.1.2 Wachstumsmedien

Zur Kultivierung der Zellen wurden folgende Wachstumsmedium verwendet:

Wachstumsmedium 1: DMEM, 5% FCS, 2 mM L-Glutamin

Wachstumsmedium 2: DMEM:F12 (1:1), 5% FCS, 2 mM L-Glutamin, 15 mM Hepes

Wachstumsmedium 3: DMEM, 5% FCS, 15 mM Hepes, 1x MEM Vitamine

Wachstumsmedium 4: DMEM, 10% FCS, 4 mM L-Glutamin, 25 mM Hepes, 1x n.e. AS, 0.1 mM β -MeEtOH, 1×10^3 U/ml LIF

3.1.3 Zellkulturreagentien

DMEM, <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	GIBCO, #41966-029
DMEM/F-12 (Ham)	GIBCO, #11039-047
FCS, <i>Fetal Calf Serum</i>	PAN, #P30-1500
L-Glutamin	PAN, #P04-80100
HEPES-Puffer	GIBCO, #15630-122
PBS, <i>Phosphate buffered Saline</i>	GIBCO, #14200-083
Trypanblau	GIBCO, #15250-061
Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO, #25300-096
β-MeEtOH	GIBCO, #31350-010
MEM Vitamine	GIBCO, #11120-037
n.e. AA, <i>nonessential amino acids</i>	GIBCO, #11140068
DMSO, Dimethylsulfoxid 99,9%	SIGMA-ALDRICH, #472301
LIF, <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>	Chemicon (Millipore), #LIF1005

3.1.4 SDS-PAGE und Western Blot Reagentien

SDS-Sammelgel	125 mM Tris-HCl-Puffer pH 6,8 0,1% SDS 0,1% APS 5% Acrylamid-Mix 0,1% Temed
SDS-Trenngel	375 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,8 0,1% SDS 0,1% APS 9,9% Acrylamid-Mix 0,04% Temed

Ladepuffer	60 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,8 1% SDS 5% Glycerol 0,01 mg/ml Bromphenolblau 0,34 M β -Mercaptoethanol SIGMA, #K929.2
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris Base 250 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3
Transferpuffer	25 mM Tris Base 250 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3 20% Methanol
Blockingpuffer	TBS-T 5% Non-Fat-Milk bzw. 5% BSA
Strippingpuffer	25 mM Glycin 1% SDS pH 2 (HCl)
Zelllysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl 1 mM Na ₂ EDTA 1 mM EGTA 1% Triton 2.5 mM sodium pyrophosphate 1 mM beta-glycerophosphate 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 μ g/ml Leupeptin Cellsignaling, #9803
Protease/Phosphatase-Inhibitoren	Thermo sciencific #78444
TBS-Tween (TBS-T)	10 mM Tris.Cl 150 mM NaCl 0,05% Tween20 pH 8,0
BCA Protein Assay Kit	Thermo Sciencific, #23225
Protein-Größen-Marker	Biorad, #161-0375 Invitrogen, <i>SeeBlue Plus2</i> , # LC5700

3.1.5 Antikörper

Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper:

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubation	Hersteller, #
P-Akt-Ser473	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #9271
P-Akt-Thr308	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #4056
Akt-gesamt	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #9272
Akt1	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #2938
Akt2	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #2964
Akt3	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #3788
P-p70 S6K-Thr389 P-p85 S6K-Thr412	1:500	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #9205
p70 S6K-gesamt p85 S6K-gesamt	1:500	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #9202
P-mTOR-Ser2448	1:1000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #2971
P-mTOR-Ser2481	1:1000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #2974
mTOR-gesamt	1:500	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #2972
HSP70	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #4876
HSP90	1:3000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #4875
β-Aktin	1:10.000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #4967
PTEN-gesamt	1:2000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #9559
P-GSK3 α-Ser21	1:2000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #9316
GSK3 α-gesamt	1:2000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #9338
P-GSK3 β-Ser9	1:2000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #9323
GSK3 β-gesamt	1:2000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #9315
P-GSK3 α/β Ser21/Ser9	1:2000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #9327
P-p44/42 MAPK (Erk1/2) Thr202/Tyr204	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #4370
p44/42 MAPK (Erk1/2)- gesamt	1:1000	5% BSA, 4°C, ü/N	CST, #4695
P-p38 MAPK- Thr180/Tyr182	1:1000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #4511
p38 MAPK-gesamt	1:1000	5% Milch, 4°C, ü/N	CST, #9212
Caspase-3 Pro&Active	1:1000	5% Milch, 4°C, ü/N	IMGEX, IMG-144A
PARP	1:1000	5% Milch, 4°C, ü/N	Pharmingen, 556494

BSA – Bovine Serum Albumin, CST – Cell Signaling Technology, ü/N – Inkubation über Nacht

Liste der in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper

Sekundär Antikörper	Verdünnung	Inkubation	Herrsteller, #
Anti-Rabbit IgG <i>HRP-linked</i>	1:1000	5% Milch/TBS-T, 1h, RT	CST, #7074
Anti-Mouse IgG <i>HRP-linked</i>	1:1000	5% Milch/TBS-T, 1h, RT	CST, #7076

3.1.6 Lösungen zur Bestimmung der Vitalität und klonogenen Überleben der Zellen *in vitro*

Kolonien-Fixierung/ Färbe-Lösung	20% Ethanol (v/v) 0,8% Ammoniumoxalat 2,0% Kristallviolett
Kolonie-Auflösung	10% SDS 15% Essigsäure
WST-1-Assay	Roche, #11644807001

3.1.7 Pharmakologische Substanzen zur Stimulation der Zellen

Perifosin	Perifosine® Selleckchem, #157716524
Doxorubicin	Adrimedac® Medac
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, #44577

3.1.8 Adenovirale Vektoren für Akt-*Knock-Down*-Experimente

Für die Akt-*Knock-Down*-Experimente wurden die SW872-Zellen mit adenoviralen Vektoren, die spezifischen und Kontroll-siRNAs beinhalten, transient transfiziert. SIRION-Biotech, Martinsried bei München.

siAkt1	Ad-h-Akt1-981 (515)
siAkt2	Ad-h-Akt2-1418 (161)
siAkt3	Ad-h-Akt3-671 (167)
Kontroll-siRNA	Ad05-scrmb1 (146)

3.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

BioPhotometer	Biorad
ELISA Reader	BMG Labtech
SDS-Gelelektrophorese-Kammer	Biorad
Nitrocellulose Membran	Millipore
Hyperfilm ECL	Amersham GE Healthcare
ECL-Entwicklerlösung	Amersham Bioscience
6-/96- <i>well</i> -Platten	Greiner
T25-/T75-Zellkultur-Flaschen	Nunc
Sterile Einmalpipetten	Sarstedt

3.2 Methoden

3.2.1 *In vitro* Zellkulturen

Für die experimentelle Arbeit wurden etablierte Zelllinien verwendet (**Tab. 3.1**). Die Kultivierung erfolgte im Zellkulturschrank in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und bei einem 5%-igen Volumenanteil CO₂. Das Kulturmedium wurde alle 2 bis 4 Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen mit Trypsin gesplittet. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination mittels PCR kontrolliert.

3.2.3 Hitzeschock und Behandlung der Zellen

Der Hitzeschock *in vitro* erfolgte in Brutschränken bei Temperaturen von 41,8°C bzw. 43°C. Die Dauer des Hitzeschocks betrug je nach Versuchsansatz 90 min bzw. 2 Std. und 30 min.

Perifosin wurde in Reinstwasser für eine Konzentration von 2,2 mM gelöst. Die Behandlung der Zellen mit Perifosin erfolgte ü/N (10 Std.) bei einem Einsatz von 5 µM.

Bei Kombinationsbehandlungen mit Doxorubicin (Lösung 2 mg/ml $\sim 3,7$ mM, Klinikapotheke) wurde es in einer Konzentration von 2,5 μ M bzw. 5 μ M zu den Zellen gegeben.

3.2.4 Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellen wurden 24 Std. vor den Behandlungen in 96-*well*-Platten ausgesät, 5.000 bis 10.000 Zellen pro *well*. Die Ansätze wurden jeweils in Tripletts durchgeführt. Zu einem festgelegten Zeitpunkt nach der Behandlung wurde das WST-1 Reagenz zugegeben und 1 bis 4 Std. bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte mittels ELISA-Reader bei 450 nm (Referenz bei 630 nm). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der metabolischen Aktivität der lebenden Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System in der Atmungskette. Dabei wird die NADH-abhängige Reaktion der enzymatischen Umsetzung einer Reduktion des Farbstoffes zu dem wasserlöslichen gelb-orangen Formazan erfasst. Je höher die Vitalität der untersuchten Zellen ist, desto stärker die Umsetzung des Farbstoffes (Berridge et al., 2005).

3.2.5 Koloniebildungstest

Der Klonogene Assay (*colony forming assay*, *CFA*) ist ein *in vitro* Test, der auf der Fähigkeit der einzelnen Zellen basiert, Kolonien zu bilden. Eine Kolonie wird hierbei als Ansammlung von mindestens 50 Zellen definiert. Mit dem Test wird untersucht, welcher Anteil an Zellen nach einer Behandlung noch fähig ist, Kolonien zu bilden (*survival fraction*). Der Klonogene Assay wurde nach Franken durchgeführt (Franken et al., 2006). Dazu wurden 24 Stunden vor der Behandlung 100 bis 300 Zellen pro Vertiefung in 6-*well*-Platten ausgesät. Nach der entsprechenden Behandlung wurden die Zellen 10-14 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien mit Kristallviolett gefärbt und fixiert. Kolonien, die die Mindestzahl von 50 Zellen pro Kolonie aufwiesen wurden quantitativ erfasst. Nachdem die Kolonienzahl bestimmt wurde, wurden die Zellen in 10%-SDS/15%-Essigsäure-Lösung aufgenommen und die Farbintensität bei 595 nm spektrometrisch gemessen um die Gesamtzellzahl zu bestimmen.

3.2.6 Präparation von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Proteinextrakten zur Proteinanalytik wurden die geernteten Zellpellets zweimal in eiskaltem PBS gewaschen, bei 300 g 5 min zentrifugiert und anschließend in 20-200 µl Lysepuffer resuspendiert. Um Proteinabbau und Dephosphorylierungen zu verhindern, wurde ein Protease/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail direkt vor der Resuspension der Zellpellets zugesetzt. Die resuspendierten Pellets wurden anschließend 15 min auf Eis inkubiert und dann bei 4°C und 18.000 g 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und eine Proteinbestimmung mittels den BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.7 Elektrophoretische Proteinauftrennung und Western Blot

Das Prinzip der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) beruht auf der Denaturierung der Proteine und derer elektrophoretischer Auftrennung nach ihrer Größe. Das Polyacrylamid-Gel wird aus Acrylamid durch eine Kettenreaktion hergestellt. APS startet und TEMED katalysiert diese Reaktion. SDS – ein anionisches Tensid – lagert sich an die Proteine und denaturiert diese. Durch die negativen Sulfatgruppen von SDS werden die Eigenladungen der Proteine ausgeglichen und die Proteine werden nach ihrer Molekulargröße im Gel aufgetrennt. Zu den Zelllysaten wird Ladepuffer gegeben und das Gemisch bei 96°C vier Minuten hitzedenaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Geltaschen mit 5-25 µg Protein beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Elektrophoresepuffer bei 120 V und 400 mA. Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel ebenfalls elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies erfolgte im Transferpuffer für 90 min bei 80 V. Anschließend wurde die Membran in einer 5% Milch/TBS-T-Lösung inkubiert, um die proteinfreien Flächen mit Milchproteinen zu benetzen bzw. zu blocken. Damit werden unspezifische Antikörperbindungen an der Nitrozellulosemembran verhindert.

3.2.8 Immunochemischer Nachweis von Proteinen

Zur Detektion der Proteine wurde das Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung genutzt. Hierzu wurde ein antigenspezifischer Primarantikörper (**3.1.5**) in 5% BSA oder 5% Milch verdünnt und ü/N bei 4°C mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Der Antikörper bindet währenddessen an das Epitop des gesuchten Proteins. Nach der Inkubation wurde die Membran in TBS-T gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran mit entsprechenden Sekundärantikörper (konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), 1:1000 in 5%-Milch/TBS-T-Lösung) für eine Stunde (RT) inkubiert. Die HRP oxidiert Luminol, das in einer zugegebenen Chemilumineszenzlösung (ECL-Entwicklungslösung) enthalten ist. Somit kommt es zu einer Lumineszenz der gesuchten und markierten Proteine, die nach einer Entwicklung auf einem fotografischen Film sichtbar werden. In allen Western Blots wurde ein Antikörper gegen β -Aktin als nicht reguliertes „Haushaltsprotein“ zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge eingesetzt.

Um weitere Proteine auf einer Membran nach der Detektion nachzuweisen, können die gebundenen Antikörper-Konjugate während einer 40-minütigen Inkubation der Membran in einem Strippingpuffer bei 37°C unter ständigem Rotieren entfernt werden.

3.2.9 Mikroskopie und Fotografie

Für die Darstellung der morphologischen Veränderungen der Zellen nach den Behandlungen wurden die Sarkomzellen vor der Proteinextraktion unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

3.2.10 siRNA-Experimente

3.2.10.1 Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi)

RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht die Expression einzelner Gene gezielt durch spezifische kurze RNA-Moleküle, sogenannten *small interfering RNAs* (siRNAs) zu unterdrücken (*Knock-Down*; KD). siRNAs, die 18-25 Nukleotide lang sind, entstehen

entweder auf natürliche Weise im Zytoplasma bei der Prozessierung einer längeren dsRNA oder werden künstlich in die Zelle zum Stilllegen von Genen eingebracht. Der *antisense*-Strang des kleinen RNA-Fragments wird anschließend in den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut, in dem er über Basenpaarbindungen an die entsprechende mRNA bindet. Anschließend wird die Ziel-mRNA durch die RNA-Helicase- und Endonuklease-Aktivitäten des RISC-Komplexes abgebaut (**Abb. 3.1**) (Behlke, 2006; Dominska, 2010).

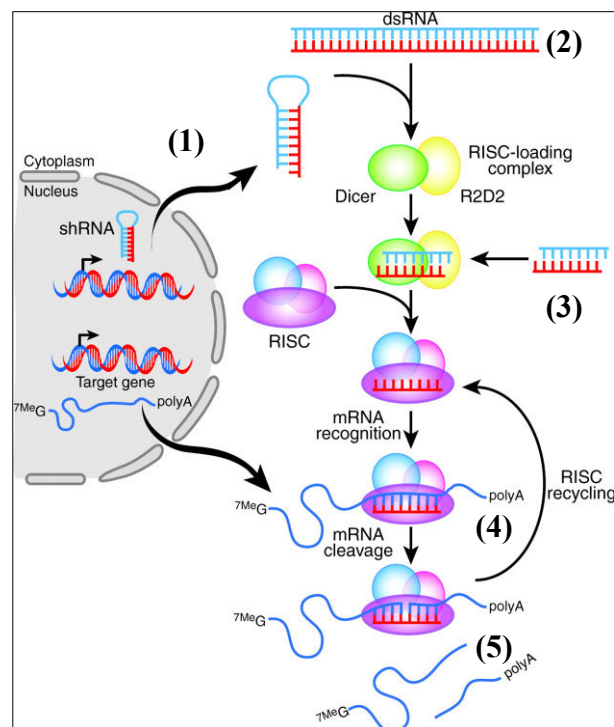


Abb. 3.1 Modell der RNA-Interferenz. Die ~21 Nukleotide lange shRNAs⁽¹⁾ entstehen entweder auf natürliche Weise im Zytoplasma bei Prozessierung einer längeren dsRNA⁽²⁾ durch das Enzym Dicer oder werden als siRNAs⁽³⁾ in die Zelle eingebracht. Der *antisense*-Strang des kleinen RNA-Fragments wird anschließend in den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut, wo er über Basenpaarbindung an die entsprechende mRNA bindet⁽⁴⁾. Dadurch gelangt der RISC-Komplex mit seinen RNA-Helicase- und Endonuklease-Aktivitäten in räumliche Nähe zur mRNA, was ihre Entwindung und ihren Abbau zur Folge hat⁽⁵⁾ (Nach Dominska, 2010).

3.2.10.2 Adenoviral vermittelte siRNA-Tranfektion

Für die Akt-KD-Experimente wurden adenovirale Vektoren, die spezifische siRNAs gerichtet gegen Akt1, Akt2 und Akt3 beinhalten, transient transfiziert. Zur Kontrolle wurde parallel die Transfektion mit unspezifischen siRNAs (*non targeting*) durchgeführt. Die Liposarkom SW872-Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen je 3×10^6 ausplattiert, nach dem die Zellen sich an den Flaschenboden angehaftet haben (nach ca. 4 Stunden) wurden diese mit adenoveralen Vektoren transient transfiziert (je 50 MOI pro Isoform bzw. 150 MOI von der *non targeting* siRNA). Die transfizierten Zellen und die Kontrollzellen wurden 90 Std. unter normalen Bedingungen (37°C) im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Perifosin (5 μ M für 10 Std.) mit anschließender Hitzeexposition (41,8°C für 2 Std. 30 min).

3.2.10.3 Das induzierbare shRNA-Expressionssystem

Die tet-induzierbare RNA-Interferenz erlaubt eine zeitliche und reversible Gen-Unterdrückung, die durch den Induktor Doxycyclin reguliert wird. In Abwesenheit des Induktors bindet der tet-Repressor an die tet-Operator-Sequenz und blockiert die Bindungsstelle der Polymerase III. Somit kann die shRNA nicht abgelesen werden. Nach Zugabe von Doxycyclin wird die Bindung des tet-Repressors an die Promotorregion verhindert. Das ermöglicht die Bindung der Polymerase III und somit die Transkription von shRNA (**Abb. 3.2**). Das Genkonstrukt zum induzierbaren PTEN-KD wurde entsprechend den SOP-Protokollen im Institut für Entwicklungsgenetik (IDG, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, unter der Betreuung von Dr. Ralf Kühn) hergestellt. Das Genkonstrukt wurde mittels RMCE (*recombinase mediated cassette exchange*) in murine embryonale Stammzellen (IDG3.2) in den ROSA26-*locus* mittels Elektroporation (300 mV) stabil transfiziert. In dieser Arbeit wurde ein generierter Klon VSb9 mit PTEN-shRNA für die Experimente angewandt. Für die Versuche wurden die VSb9-Zellen ausplattiert und nachdem die Zellen sich an dem Zellkulturgefäß angehaftet hatten (ca. 4 Stunden), erfolgte die Zugabe von Doxycyclin in der Konzentration von 1 μ g/ml und 5 μ M Perifosin. Die Zellen wurden 48 Stunden inkubiert und danach einem Hitzeschock bei 41,8°C bzw.

bei 43°C für 90 min ausgesetzt. Die Zellen wurden bezüglich ihrer Vitalität, ihres klonogenen Überlebens und ihrer Proteinexpression analysiert.

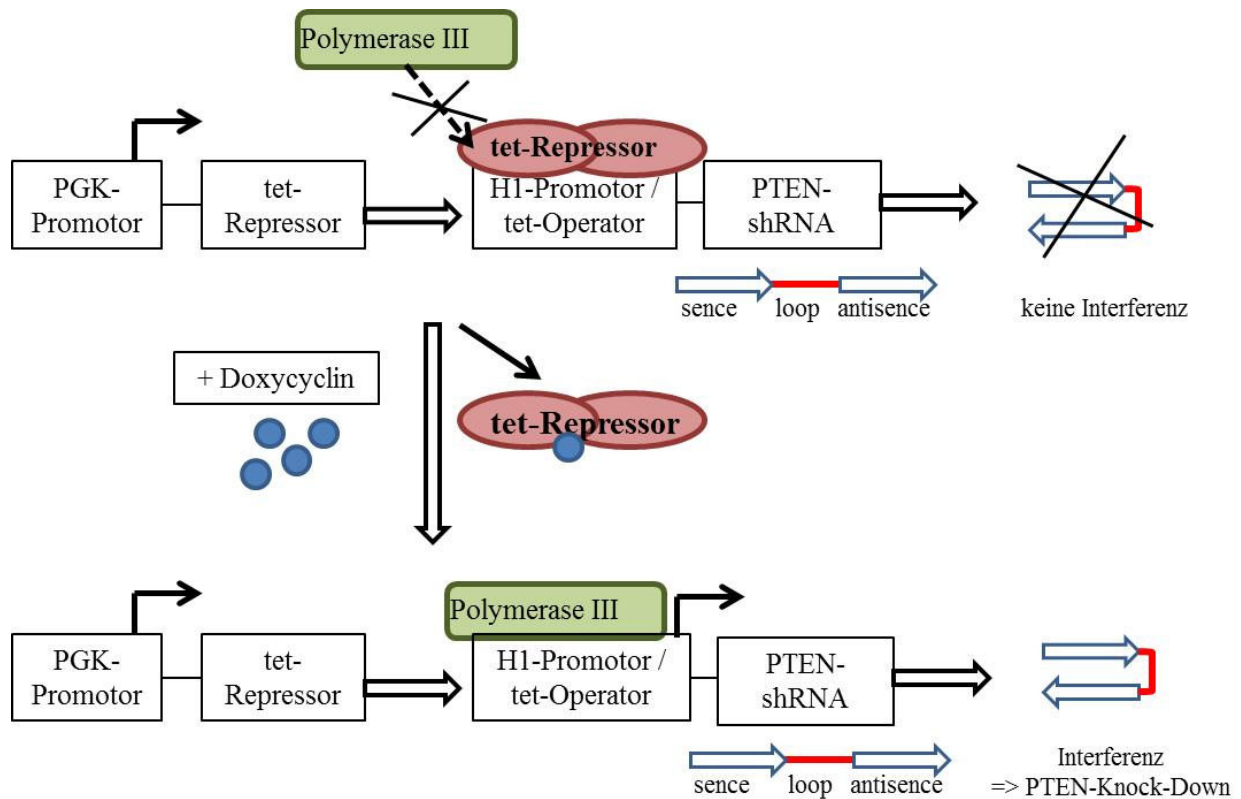


Abb.3.2 Schematische Darstellung der tet-induzierbaren RNA-Interferenz. In Abwesenheit des Induktors Doxycyclin bindet das tet-Repressor an die tet-Operator-Sequenz – die sich im Promotorregion der shRNA befindet – und blockiert die Bindungsstelle der Polymerase III. Somit kann die shRNA nicht abgelesen werden. Nach Zugabe von Doxycyclin wird die Bindung des tet-Repressors an die H1-Promotorregion verhindert. Dies ermöglicht die Bindung der Polymerase III an den Promotor und die Transkription der shRNA wird gestartet.

3.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden Microsoft Excel® und SPSS Daten-Editor® verwendet. Bei der deskriptiven Statistik wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte von drei bis sechs unabhängigen Experimenten samt Standardabweichung präsentiert. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurden der Student T-Test und ANOVA mit Tukey post hoc Analyse eingesetzt. Der p-Wert wird wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Akt-mTOR-Signalweges nach einem Hitzeschock bei 41,8°C

Eine der zellulären Antworten auf äußere Stressfaktoren ist die Aktivierung des Akt-mTOR-Signalweges, der eine wichtige Rolle im Zellüberleben spielt (Matsuzaki et al., 2004; Kakigi et al., 2011). Ziel dieses Experiments war es zu untersuchen, ob eine Hitzeexposition bei einer klinisch relevanten Temperatur den Akt-mTOR-Signalweg in humanen Krebszellen beeinflusst. Dafür wurden Veränderungen im Phosphorylierungsstatus der wichtigsten Proteine des Akt-mTOR-Signalweges mittels Western Blot Verfahren in den drei Sarkomzelllinien Liposarkom (SW872), Rhabdomyosarkom (A673), Osteosarkom (MG63) und in einer Pankreaskarzinomzelllinie (FG) analysiert.

Als Kontrolle der Hitzeschockbehandlung wurde die durch die Behandlung induzierte Expression des Hitzeschockproteins 70 (HSP70) untersucht. Die Expression von HSPs wird durch einen Hitzeschock hochreguliert und sie fungieren als Chaperone für Signal-, Struktur- und Enzymproteine. Dadurch stellen HSPs einen Schutzmechanismus gegen den Funktionsverlust essentieller Moleküle dar und tragen zum Überleben der unter Stress stehenden Zellen bei (Lindquist and Craig, 1988; Becker and Craig, 1994; Multhoff et al., 1999).

Der Hitzeschock bei 41,8°C wurde für einen Zeitraum von eins bis sechs Stunden angesetzt. Direkt nach der Hitzeexposition wurden die Proteine der behandelten Zellen extrahiert.

Die Proteinanalyse mittels Western Blot (**Abb.4.1**) zeigte in allen getesteten Zelllinien eine zunehmende Induktion der HSP70-Expression über den gesamten Zeitraum von eins bis sechs Stunden kontinuierlicher Hitzeexposition.

Die phosphorylierte Form von Akt sowohl am Ser473 (mTORC2-vermittelte Phosphorylierung) als auch am Thr308 (PDK1-vermittelte Phosphorylierung) konnte bereits in allen unbehandelten Zellen erkannt werden. Die Phosphorylierung stieg allerdings bereits nach einer einstündigen Inkubation bei 41,8°C deutlich an und blieb

über die sechsstündige Expositionsdauer aller Zelllinien bei 41,8°C erhöht. Die Analyse des Phosphorylierungsstatus von mTOR-Ser2481 und p70/p85 S6K-Thr389/-Thr412 zeigte ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung in hitzeexponierten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, während die Gesamtexpressionsmenge dieser Proteine in den Zellen über die gesamte Behandlungsdauer hinweg konstant geblieben ist (**Abb. 4.1**).

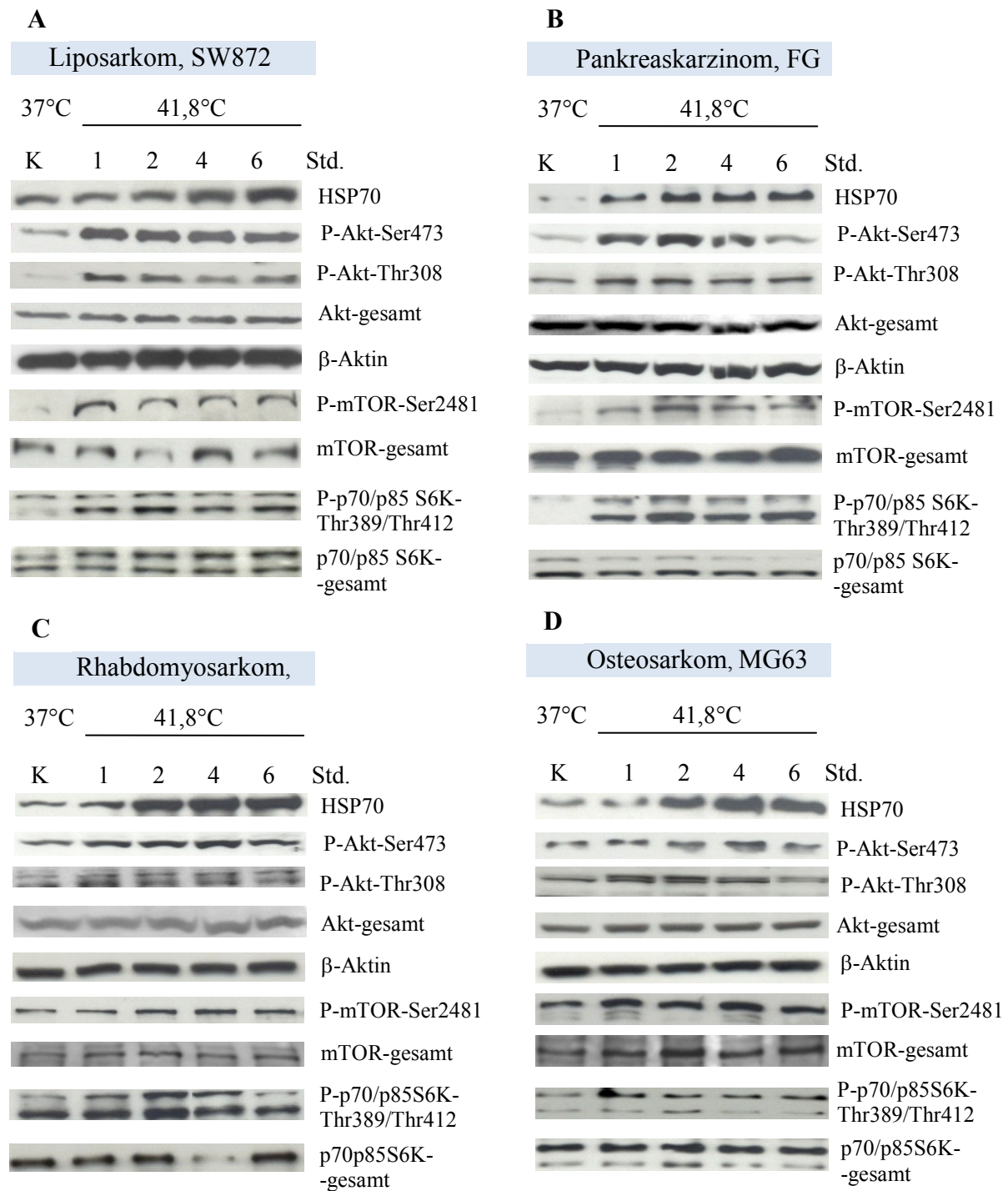


Abb. 4.1 Ein Hitzeschock induziert die Phosphorylierungen der Akt-mTOR-p70/p85 S6K-Signalkaskade. Die Liposarkom SW872- (A), Pankreaskarzinom FG- (B), Rhabdomyosarkom A673- (C) und Osteosarkom MG63-Zellen (D) wurden für eine bis sechs Stunden einem Hitzeschock bei 41,8°C ausgesetzt. Anschließend wurden die Proteinextrakte mittels Western Blot analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

Die semiquantitative Auswertung der Phosphorylierung von Akt in SW872-Zellen zeigte, dass nach einer zwei- bis sechsständigen Inkubation bei 41,8°C eine Abnahme der Phosphorylierung von Akt stattgefunden hat. Diese betrug allerdings weiterhin ein Vielfaches des Kontrollwertes (**Abb. 4.2**). Die Phosphorylierung der mTOR- und p70S6-Kinasen ließ nach einer sechsständigen Hitzeexposition nur mäßig nach. Die p85S6-Kinase war während der mehrständigen Hitzeexposition dauerhaft phosphoryliert (**Abb. 4.2**).

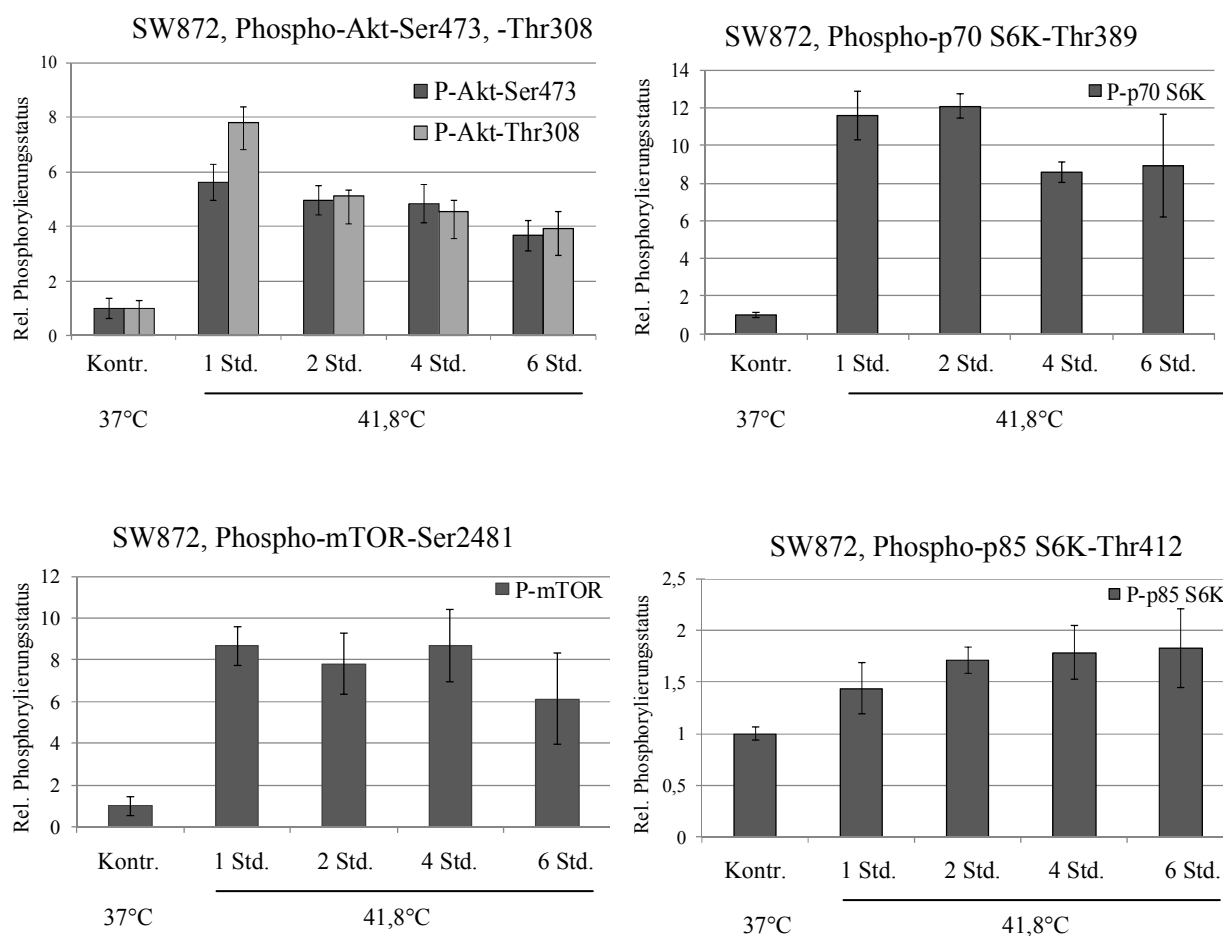


Abb. 4.2 Semiquantitative Auswertung der hitzeschockbedingten Phosphorylierung von Akt, mTOR und p70/p85 S6K in SW872-Zellen. Die Intensitäten der Banden im Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen wurden mit dem Programm ImageJ densitometrisch analysiert und der Quotient aus der Intensität der Phosphorylierung und dem Haushaltsprotein β -Aktin gebildet. Die Kontrolle wurde auf 1 normiert und die Messwerte auf die Kontrolle relativiert, n=3.

Die Ergebnisse zeigen, dass während eines subletalen Hitzeschocks bei 41,8°C eine rapide und dauerhaft aktivierende Phosphorylierung des Akt-mTOR-Signalweges stattgefunden hat.

4.2 Analyse zum Einfluss von Perifosin auf die Akt-Phosphorylierung unter physiologischen und Hitzeschock-Bedingungen

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Akt an seiner katalytischen Domäne (Ser473) und an seiner Aktivierungs-Domäne (Thr308) in den untersuchten Zelllinien während eines Hitzeschocks stark hochreguliert wurde. In diesem Experiment wurde überprüft, ob der Akt-Inhibitor Perifosin die Hitzeschockvermittelte Akt-Phosphorylierung *in vitro* verhindern kann. Dafür wurden die SW872 Liposarkom- und MG63 Osteosarkomzellen zehn Stunden vor einem Hitzeschock mit Perifosin in einer Konzentration von 5 μ M präinkubiert. Der Phosphorylierungsstatus von Akt am Ser473 und am Thr308 wurde direkt nach der Hitzeexposition der SW872 (**Abb. 4.3**) und MG63-Zellen (**Abb. 4.4**) mittels Western Blot analysiert.

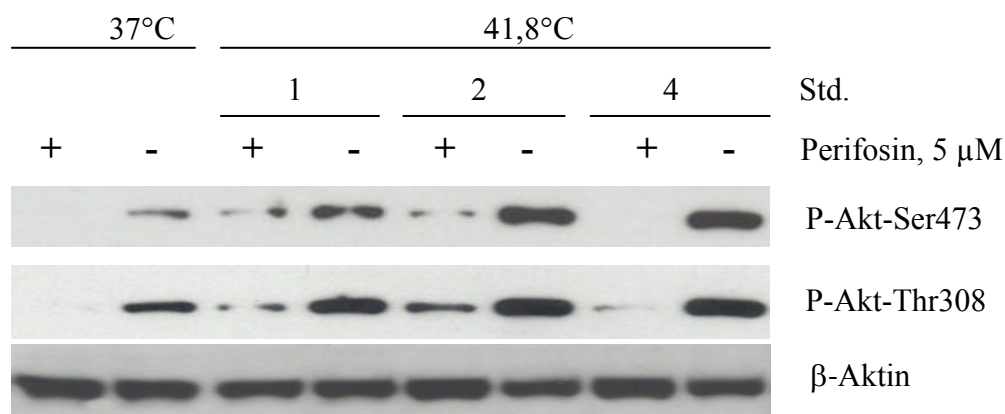


Abb. 4.3 Perifosin verhindert die hitzeschockvermittelte Induktion der Phosphorylierung von Akt-Ser473 und Akt-Thr308 in Liposarkomzellen. Die SW872-Zellen wurden zehn Stunden mit 5 μ M Perifosin präinkubiert und einem Hitzeschock bei 41,8°C für eins, zwei und vier Std. ausgesetzt und anschließend für die Proteinextraktion geerntet. Der Phosphorylierungsstatus von Akt-Ser473 und Akt-Thr308 wurde über die Western Blot Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

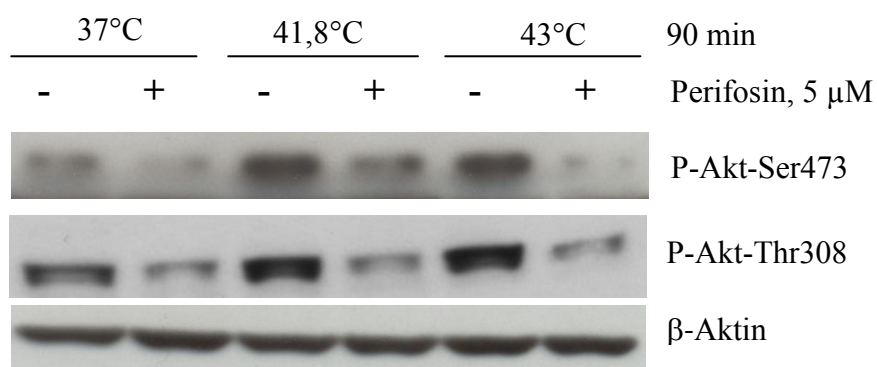


Abb. 4.4 Perifosin verhindert die hitzeschockvermittelte Induktion der Phosphorylierung von Akt-Ser473 und Akt-Thr308 in Osteosarkomzellen. Die MG63-Zellen wurden zehn Stunden mit 5 µM Perifosin vorbehandelt. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 41,8°C und 43°C für 90 min. Anschließend wurden die Proben für die Proteinextraktion geerntet. Der Phosphorylierungsstatus von Akt-Ser473 und Akt-Thr308 wurde über die Western Blot Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern ermittelt. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

Die Ergebnisse dieser Experimente haben bestätigt, dass die phosphorylierte Form von Akt (P-Akt-Ser473 und -Thr308) in den unbehandelten Sarkomzellen SW872 und MG63 bereits im unstimulierten Zustand vorliegt.

In **Abb. 4.3** ist zu erkennen, dass diese Phosphorylierungen während der ein- bis vierstündigen Hitzeexposition der SW872-Zellen bei 41,8°C deutlich angestiegen sind. Die Behandlung der Zellen mit Perifosin resultierte in einer vollständigen Unterdrückung der Akt-Phosphorylierung in den Kontrollzellen (37°C) und trug wesentlich zu einer Verminderung der hitzeinduzierten Phosphorylierung bei. In den mit Perifosin behandelten SW872-Zellen bewirkte der Hitzeschock eine leichte Induktion von Phospho-Akt, jedoch wesentlich geringer als in den unbehandelten Zellen.

An den Osteosarkom MG63-Zellen (**Abb. 4.4**) konnte gezeigt werden, dass ein Hitzeschock bei 43°C, ähnlich wie ein Hitzeschock bei 41,8°C, eine Phosphorylierung der Akt-Kinase am Ser473 und am Thr308 induziert. Hier wurde die hitzebedingte Induktion der Phosphorylierung ebenfalls durch eine Perifosinbehandlung deutlich vermindert. Perifosin zeigte sich als ein wirksamer Inhibitor der basalen und der hitzeinduzierten Akt-Phosphorylierung.

4.3 Ermittlung der Hitzeempfindlichkeit von Zellen unter PTEN-Knock-Down

Der Tumorsuppressor PTEN spielt eine entscheidende Rolle in der negativen Regulation des Pi3K-Akt-mTOR-Signalweges und wirkt somit den zellproliferations- und wachstumsfördernden Stimulationen entgegen. Ein Funktionsverlust von PTEN, der in vielen Tumorarten auftritt, führt zu einer Hyperaktivierung der Akt-Kinase (Zhang und Yu, 2010). Es stellt sich daher die Frage, ob Zellen mit PTEN Defiziten bzw. mit hyperaktiven Akt-Kinasen Änderungen in der Hitzeempfindlichkeit im Vergleich zu Zellen mit intaktem PTEN aufweisen. Um die Hitzeempfindlichkeit solcher Zellen zu überprüfen, wurde die VSb9-Zelllinie (murinen embryonalen Stammzellen) verwendet, in der eine Doxycyclin-induzierbare Expression der shRNA gegen PTEN hervorgerufen werden kann.

Mittels Western Blot-Verfahren konnte gezeigt werden, dass durch die Expression der PTEN-shRNA eine sehr effektive PTEN-Unterdrückung in den VSb9-Zellen erreicht werden konnte. Als Folge des PTEN-KD wurde eine vervielfältigte Akkumulation von phosphoryliertem Akt bestimmt und zwar sowohl an der katalytischen Domäne (Thr308), als auch an der regulatorischen Domäne (Ser473) (**Abb. 4.5**).

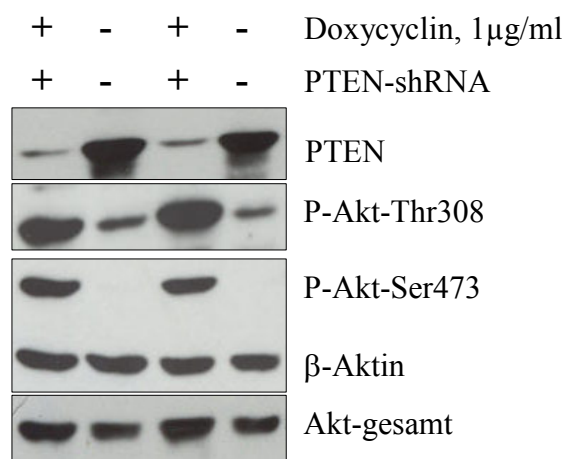


Abb. 4.5 PTEN-Knock-Down resultiert in einer Hyperphosphorylierung von Akt. Die murinen VSb9-Zellen wurden 48 Stunden in Anwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Proteinextraktion geerntet. PTEN, Phospho-Akt-Thr308 und -Ser473 wurden mittels spezifischen Antikörpern detektiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

4.3.1 Die Vitalität von VSb9-Zellen unter PTEN-Knock-Down nach einer Perifosinbehandlung und Hitzeexposition

Um zu untersuchen, welchen Effekt eine PTEN-Unterdrückung und die daraus resultierende Akt-Hyperaktivierung auf die Zellvitalität nach einem Hitzeschock hat, wurde mittels WST-1-Assays die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt.

Nach einer 48-stündigen Koinkubation mit Doxycyclin (1 µg/ml) und 5 µM Perifosin bei 37°C wurden die Zellen einem 90-minutigen Hitzeschock bei 41,8°C bzw. 43°C ausgesetzt. Der Effekt der Behandlungen in Hinsicht auf die Vitalität und Proliferation wurde 48 Stunden nach dem Hitzeschock analysiert (**Abb. 4.6**).

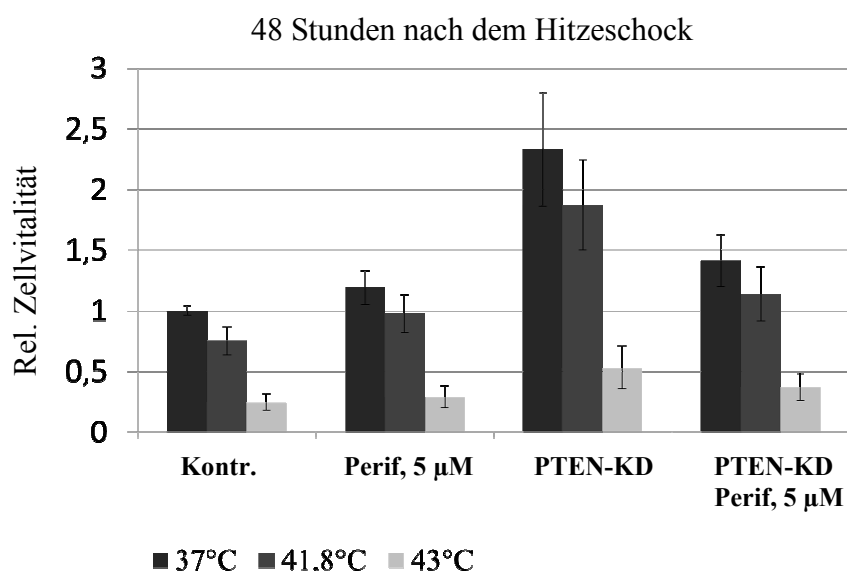


Abb. 4.6 Vitalität und Proliferation von VSb9-Zellen unter PTEN-Knock-Down und einer Perifosinbehandlung nach einem Hitzeschock. Die murinen embryonalen VSb9-Zellen wurden in 96-well Zellkultur-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) sowie 5 µM Perifosin. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen einem Hitzeschock bei entweder 41,8°C oder 43°C für 90 min ausgesetzt. Die WST-1 Analyse erfolgte 48 Stunden nach dem Hitzeschock. Der Kontrollwert, ausgehend von drei unabhängigen Versuchen, wurde auf 1 normiert, n=3.

Die Vitalität und die Proliferation der Zellen mit unterdrücktem PTEN erhöht sich um das ca. 2,5-fache im Vergleich zur Kontrolle. Auch die PTEN-defizienten Zellen, die einem subletalen Hitzeschock bei 41,8°C ausgesetzt wurden, zeigten eine signifikant verstärkte Proliferation und Vitalität im Vergleich zu Zellen mit intaktem PTEN unter den gleichen Bedingungen. Ein 90-minütiger Hitzeschock bei 43°C bewirkte in den VSb9 Zellen allerdings eine drastische Reduktion der Vitalität, die bei den Zellen ohne

induzierten PTEN-KD auf ca. 20% der Kontrolle absank. Dies konnte durch einen PTEN-KD kaum verhindert werden. Dieser Sachverhalt weist auf eine hohe Hitzeempfindlichkeit der ausgewählten Modellzelllinie hin.

Interessanterweise beeinflusste eine Perifosinbehandlung die Kontrollzellen kaum, reduzierte aber die Vitalität und die Proliferationsrate der unbehandelten und hitzeexponierten PTEN-KD-Zellen deutlich.

Der Einfluss einer dualen Perifosin- und Hitzeschockbehandlung wurde auf molekularer Ebene anhand des Phosphorylierungsstatus von Akt-Ser473 durch eine Western Blot Analyse bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach dem gleichen Schema wie für den Vitalitätstest behandelt. Hier erfolgte die Ernte der Zellen für die Proteinextraktion direkt nach der Hitzeexposition.

Die Analyse ergab, dass ein Hitzeschock bei 43°C eine starke Phosphorylierung der Akt Kinase induzierte, während dieser Effekt bei 41,8°C nur in geringerem Ausmaß zu beobachten war. Perifosin bewirkte eine erkennbare Verringerung der PTEN-KD- und hitzeschockbedingten Induktion der Akt-Phosphorylierung, allerdings mit unterschiedlichen Wirksamkeiten innerhalb der angesetzten Konzentration (**Abb. 4.7**).

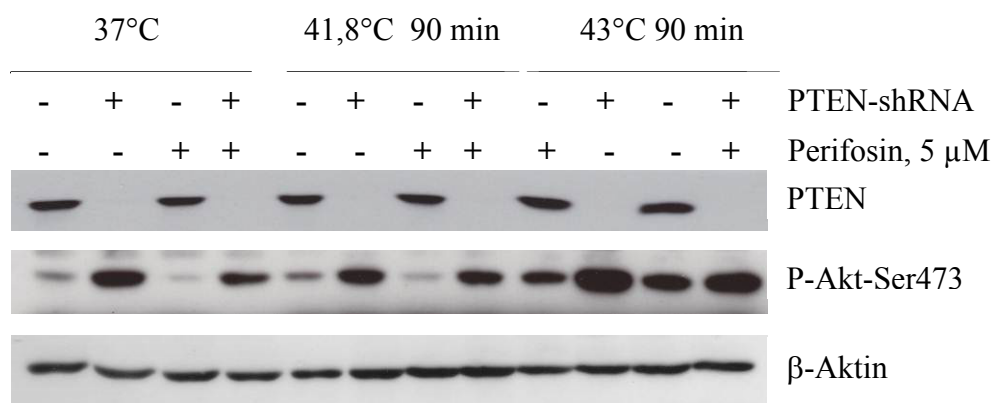


Abb. 4.7 Perifosin verringert die PTEN-Knock-Down und Hitzeschock-bedingte Phosphorylierung von Akt. VSb9-Zellen wurden 48 Stunden in Anwesenheit von Doxycyclin (1 µg/ml) und Perifosin (5 µM) inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 41,8°C bzw. 43°C für 90 min ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen für die Proteinextraktion geerntet. PTEN und der Phosphostatus von Akt-Ser473 wurde mittels Western Blot ermittelt. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

4.3.2 Das klonogene Überleben der VSb9-Zellen unter PTEN-Knock-Down nach einer Perifosinbehandlung und Hitzeexposition

Der Funktionsverlust von PTEN und die daraus resultierende Akkumulation von phosphoryliertem Akt führten zu einem beträchtlichen Anstieg der Zellproliferationsrate bzw. der Zellvitalität (**Abb. 4.5**). Die Ermittlung von Langzeiteffekten eines PTEN-KD auf die Zellproliferation und das Überleben nach Hitzeschock mit oder ohne eine Perifosinbehandlung wurde mittels Klonogenen Assays (*Colony Forming Assay, CFA*) durchgeführt.

Die nach zwölf Tagen gebildeten Kolonien wurden fotografiert (**Abb. 4.8 A**), ausgezählt (**Abb. 4.8 B**) und anschließend für die spektrometrische Messungen solubilisiert (**Abb. 4.8 C**).

Dem Klonogenen Assay zufolge, kam es nach der Behandlung der Zellen mit einem Hitzeschock bei 41,8°C für 90 Minuten zu einer Abnahme der Kolonienzahl. Eine radikale Reduzierung der Kolonienzahl konnte nach einem 90-minütigen Hitzeschock bei 43°C festgestellt werden. Wie die fotografischen Aufnahmen illustrieren, waren die Kolonien bei einem PTEN-KD im Vergleich zu den Kolonien mit intaktem PTEN viel größer. Die Anzahl der gebildeten Kolonien war ebenfalls höher (um 10-15%), wenn PTEN aktiv unterdrückt wurde. Diese Auswirkung des PTEN-Mangels war bei den Zellen zu erkennen, die bei 37°C gewachsen waren, sowie bei den Zellen, die einem Hitzeschock bei 41,8°C und bei 43°C für jeweils 90 min ausgesetzt waren. Die Behandlung dieser Zellen mit 5 µM Perifosin führte zu einer Reduzierung der Koloniegröße sowie der Koloniezahl um etwa 10-20% im Vergleich zu PTEN-KD-Zellen, die nicht mit Perifosin behandelt wurden.

Zur Auswertung der Gesamtzellzahl (Koloniezahl und Koloniegröße), wurden die Kolonien in 10%-SDS/15%-Essigsäure-Lösung solubilisiert und die Absorption der erhaltenen Lösung bei 595 nm spektrometrisch bestimmt (**Abb. 4.8 C**). Durch diese Auswertung, in der die Farbintensität proportional zur Zellzahl ist, zeigte sich ein starker Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungen und die bekräftigt die Ergebnisse des Zellvitalität/Proliferations-Testes. Ähnlich wie bei der WST-1 Analyse (**Abb. 4.6**), zeigte Perifosin eine kaum erkennbare Wirkung auf die VSb9-Zellen mit einer normalen PTEN-Expression. Im Gegensatz dazu wurde die

Kolonienbildungsfähigkeit der VSb9-Zellen mit einem PTEN-KD durch eine Perifosinbehandlung deutlich unterdrückt und die Hitzeempfindlichkeit wurde im Vergleich zu den VSb9-Zellen mit PTEN-KD ohne Perifosinbehandlung verstärkt.

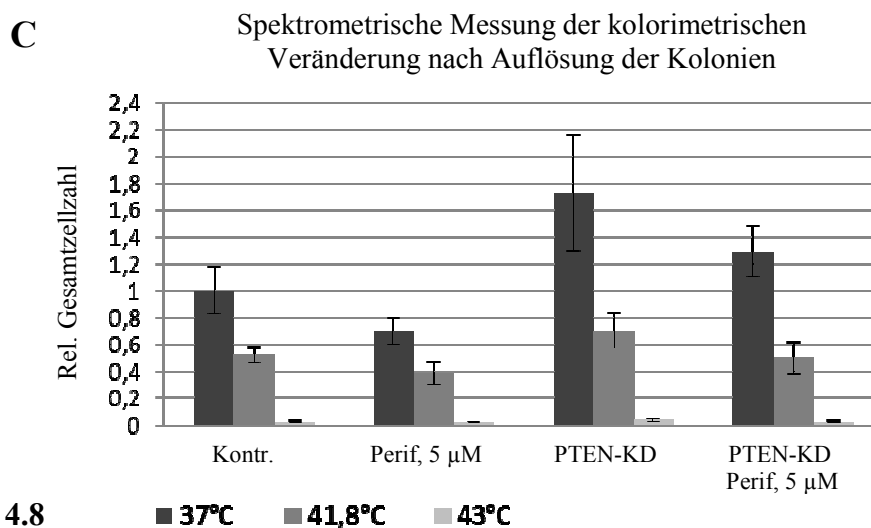
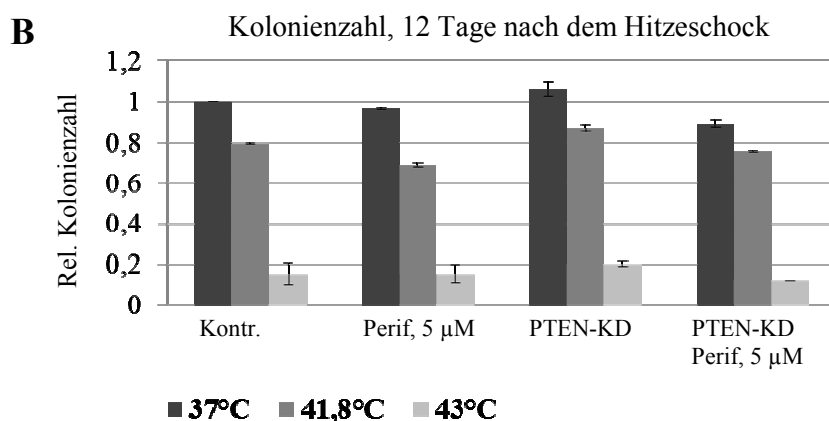
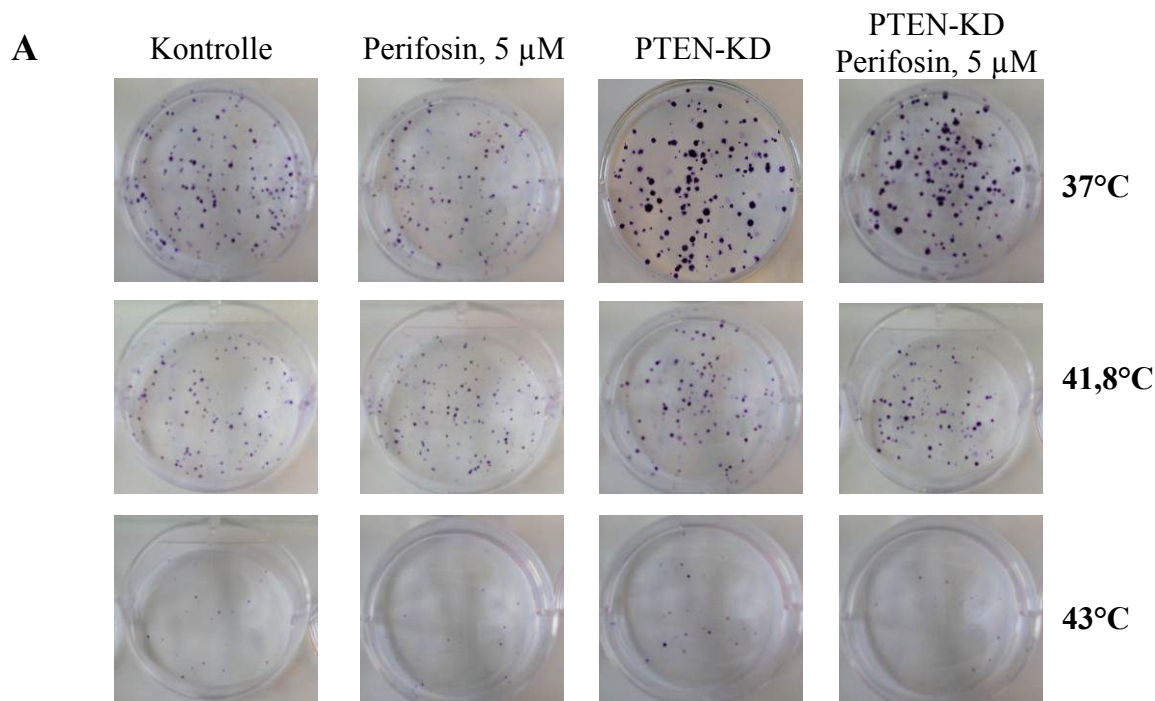


Abb. 4.8

Abb. 4.8 Koloniebildung von VSb9-Zellen unter PTEN-KD, Perifosin und Hitzeschock-Bedingungen. VSb9-Zellen wurden in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät und nach acht Stunden mit Doxycyclin (1 µg/ml) und Perifosin (5 µM) behandelt. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 41,8°C und 43°C für 90 min unterzogen und weitere zwölf Tage bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde jeden vierten Tag ohne weitere Zugabe von Doxycyclin und Perifosin gewechselt. Die Kolonien wurden mit Kristallviolett angefärbt (**A**) und die, die mindestens 50 Zellen pro Kolonie aufwiesen, wurden in die Auswertung einbezogen (**B**). Anschließend wurden die Kolonien solubilisiert und die Absorbtion (Farbintensität proportional zur Zellzahl) bei 595 nm spektrometrisch bestimmt (**C**). Der Kontrollwert, ausgehend von drei unabhängigen Versuchen, wurde auf 1 normiert, n=3.

4.4 Untersuchungen zum Einfluss von Perifosin auf die Vitalität und das klonogene Überleben von Sarkomzellen nach einem Hitzeschock

Die Experimente mit einem PTEN-KD deuten darauf hin, dass die Hyperaktivierung des Akt-mTOR-Signalweges wesentlich zur erhöhten Proliferation von unbehandelten und bei einem subletalen Hitzeschockexponierten Zellen beiträgt, ohne die Überlebensrate der Zellen zu beeinflussen (Koloniezahl). Daher stellt sich die Frage, ob eine hitzebedingte Akt-Aktivierung während eines Hitzeschocks in Abhängigkeit von PTEN-Status auftritt und ob die konstitutive Akt-Aktivierung einen Einfluss auf die Überlebensrate der Sarkomzellen hat? Um dies zu untersuchen, wurde PTEN und die konstitutive Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot überprüft und in den nachfolgenden Experimenten wurde anhand verschiedener Methoden die Überlebensrate der Sarkomzellen nach einem Hitzeschock mit oder ohne Vorbehandlung mit Perifosin analysiert.

Der PTEN-Status in den untersuchten Sarkomzellen hat gezeigt, dass Liposarkom SW872-Zellen über kein PTEN verfügen. Als Folge ist der Phosphostatus von Akt relativ hoch und bleibt in Medium unabhängig von Wachstumsfaktoren konstant. HT1080- und MG63-Zellen hingegen exprimieren PTEN und die Intensität der Akt-Phosphorylierung wurde durch Wachstumsfaktoren im Medium reguliert (**Abb. 4.9**).

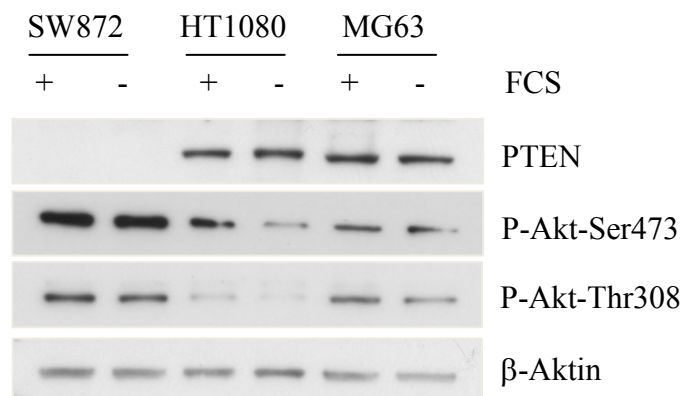


Abb. 4.9 Western Blot Analyse von PTEN, P-Akt-Ser473, -Thr308 unter Stimulation mit FCS. Die Sarkomzellen wurden im Medium mit bzw. ohne FCS für 24 Std. inkubiert und anschließend für die Proteinextraktion geerntet. β-Aktin diene als Ladekontrolle, n=2.

Für die Bestimmung der Vitalität wurden Liposarkom SW872-, Fibrosarkom HT1080- und Osteosarkom MG63-Zellen zehn Stunden mit steigenden Perifosin-Konzentrationen (1-15 μ M) vorbehandelt und anschließend einem Hitzeschock bei 41,8°C bzw. 43°C für zweieinhalb Stunden ausgesetzt. Ein WST-1-Assay wurde 48 Stunden nach dem Hitzeschock durchgeführt (**Abb. 4.10**).

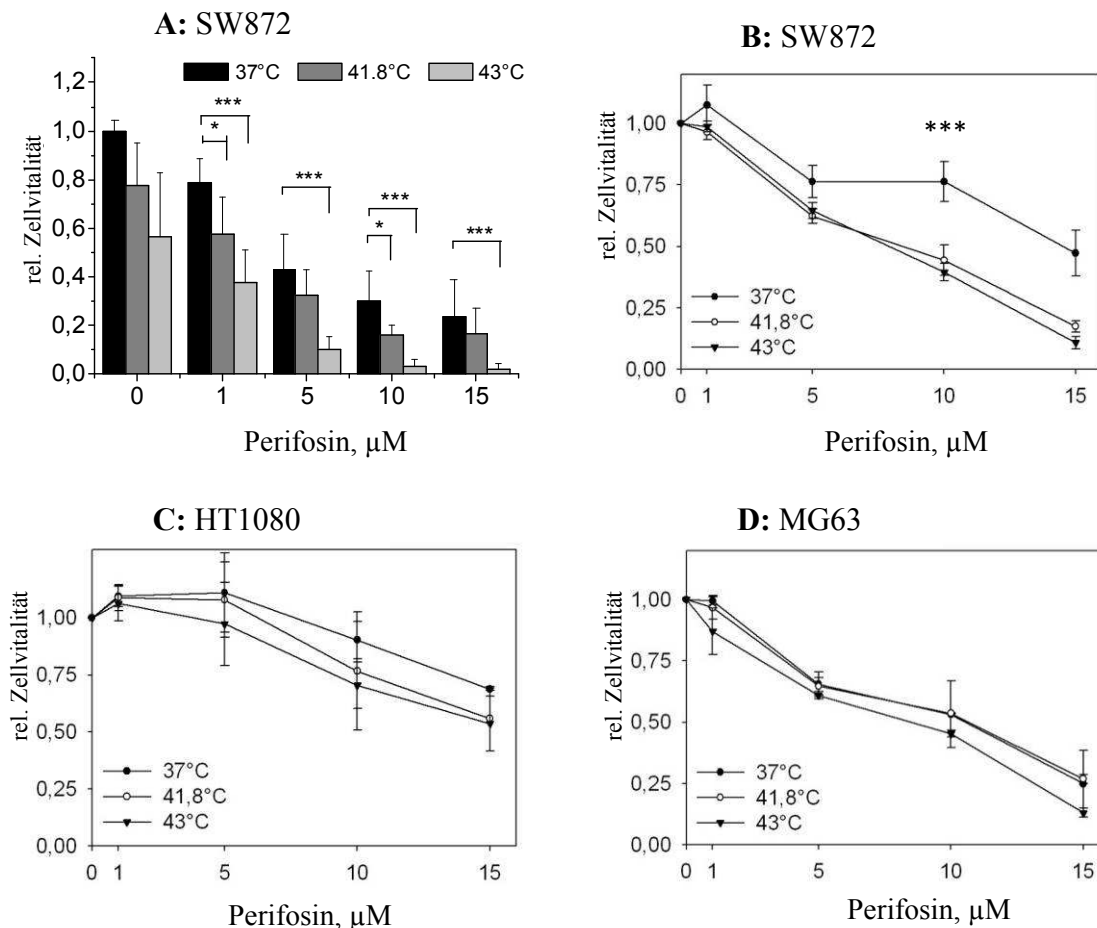


Abb. 4.10 Vitalität der Sarkomzellen nach einer Behandlung mit Perifosin und einem Hitzeschock. Liposarkom SW872-, Fibrosarkom HT1080- und Osteosarkom MG63-Zellen wurden mit steigenden Perifosin-Konzentrationen (1-15 μM) für zehn Stunden präinkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 41,8°C bzw. 43°C für 2 Std. und 30 min unterzogen. Die Vitalität wurde 48 Std. nach dem Hitzeschock mittels WST-1-Assay gemessen. In **A** wurde der Kontrollwert (37°C, 0 μM Perifosin) auf 1 normiert, n=3. In **B**, **C**, **D** wurden die toxischen Hitzeeffekte korrigiert, indem der Wert von 0 μM Perifosin bei den jeweiligen Temperaturen auf 1 normiert wurde, um den verstärkenden Effekt von Perifosin zu analysieren, n=3.

Die Daten zeigen, dass die Vitalität der Sarkomzellen bei 37°C mit zunehmender Perifosinkonzentration abgenommen hat, allerdings unterschiedlich stark innerhalb der analysierten Sarkomzelllinien. Eine zweieinhalbstündige Hitzeexposition bei 41,8°C und 43°C bewirkte eine besonders ausgeprägte Verstärkung des Vitalitätsverlustes der SW872-Zellen (**Abb. 4.10 A, B**). Die Vitalität von HT1080-Zellen, die durch die Perifosinbehandlung nur mäßig beeinflusst wurde, war nach dem Hitzeschock auch nur geringfügig reduziert (**Abb. 4.10 C**). Die Osteosarkom MG63-Zellen (**Abb. 4.10 D**) reagierten am empfindlichsten auf die Perifosinbehandlung im Vergleich zu den

anderen Sarkomzelllinien. Die Vitalität von MG63-Zellen konnte hier durch die Perifosinbehandlung kaum gesenkt werden.

Diese Messergebnisse der Vitalität der drei verschiedenen Sarkomzelllinien deuten darauf hin, dass die Hitzeempfindlichkeit der Zellen, sowie deren Ansprechrate auf den Akt-Inhibitor Perifosin abhängig vom jeweiligen Zelltyp sind.

Die Langzeiteffekte der Kombinationsbehandlung wurden im klonogenen Assay, der 14 Tagen nach der letzten Behandlung an den Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen durchgeführt wurde, revidiert. Bei beiden untersuchten Zelllinien bewirkte Perifosin in einer Konzentration von 5 μ M eine Reduktion der Anzahl und Größe der aus einzelnen Zellen ausgebildeten Kolonien im Vergleich zu den Kolonien der unbehandelten Zellen (**Abb. 4.11 links**). Die fotografischen Aufnahmen verdeutlichen, dass Perifosin die Bildung der Kolonien bei beiden Sarkomzelllinien verminderte (**Abb. 4.11 rechts**). Dieser Effekt war bei SW872-Zellen bei 37°C viel stärker ausgeprägt, als bei MG63-Zellen. Dies unterschied sich wesentlich von deren Empfindlichkeit auf die Perifosinbehandlung, die anhand der zellulären metabolischen Aktivität 48 Std. nach dem Hitzechock gemessen wurde.

Ein Hitzeschock bei 41,8°C reduzierte die Koloniebildung bei beiden Zelllinien um ca. 20%. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Perifosin weiter verstärkt. Wie unter normalen (37°C) Bedingungen, zeigte Perifosin auch bei 41,8°C eine größere Auswirkung auf SW872-Zellen und reduzierte deren Koloniezahl um weitere 45%. Bei einem Hitzeschock bei 43°C konnten nur 40% der SW872-Zellen Kolonien bilden. Bei einer Kombinationsbehandlung mit Perifosin reduzierte sich die Anzahl der herangewachsenen Kolonien bis auf etwa 10%. MG63-Zellen waren vergleichbar hitzeempfindlicher als SW872-Zellen, aber die Koloniebildung wurde bei jeder Temperatur durch Perifosin um nur 20% vermindert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Effekte der Kombinationsbehandlung mit Perifosin und einem Hitzeschock abhängig von der Zelllinie sind. Eine Verstärkung der Hitzeempfindlichkeit durch Perifosin ist insbesondere bei Liposarkom SW872-Zellen ausgeprägt.

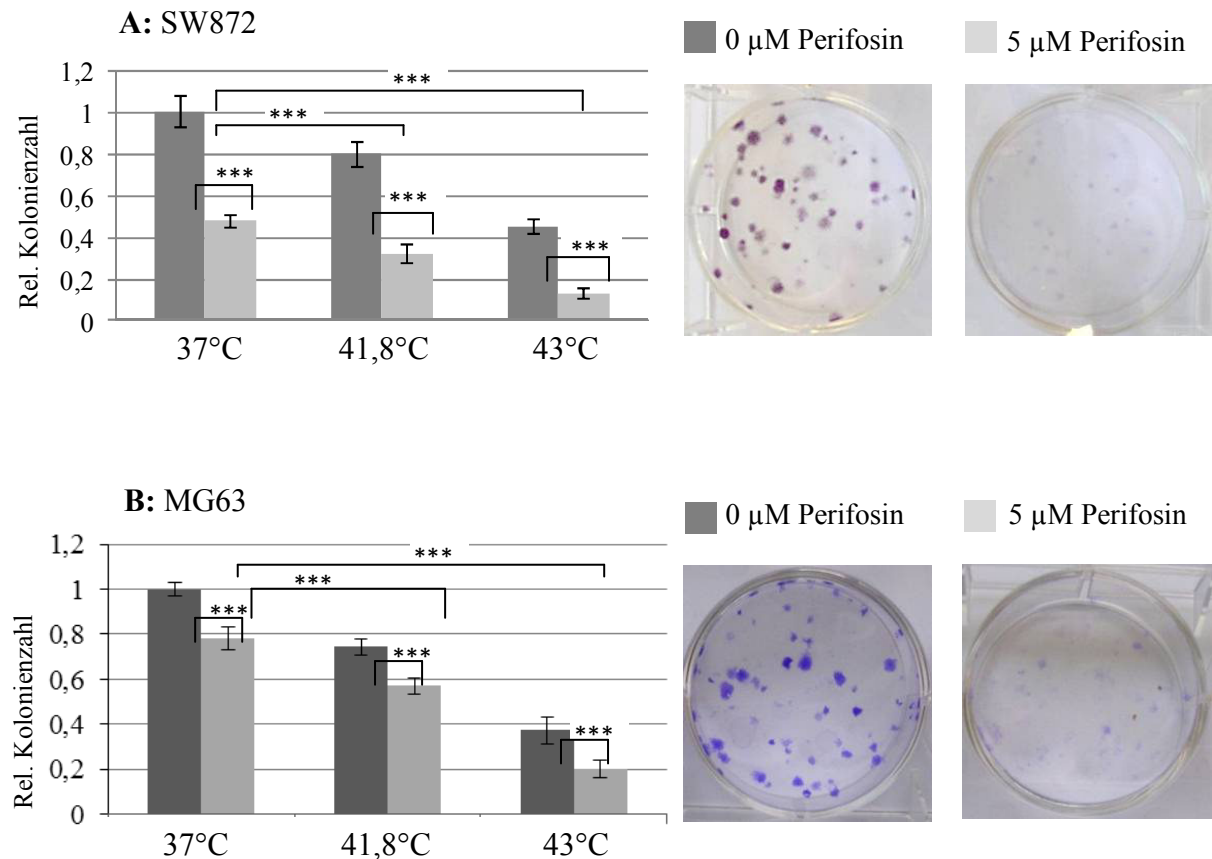


Abb. 4.11 Klonogenes Überleben der Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen nach einem Hitzeschock und einer Perifosinbehandlung. SW872- (A) und MG63-Zellen (B) wurden je 300 Zellen/well in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 5 µM Perifosin und eine weitere 10-stündige Inkubation bei 37°C mit einem anschließenden Hitzeschock bei 41,8°C und 43°C für 2 Std. und 30 min. 14 Tage nach dem Hitzeschock wurden die Kolonien mit Kristallviolett gefärbt, Kolonien mit mindestens 50 Zellen/Kolonie wurden ausgezählt und der Mittelwert +/- SD von drei unabhängigen Versuchen grafisch dargestellt (A, B links). Der Kontrollwert bei 37°C wurde auf 1 normiert, n=3. Die Kolonien der unbehandelten und der mit Perifosin behandelt Zellen wurden fotografiert (A, B rechts).

4.5 Untersuchungen zum Überleben von Sarkomzellen nach einer Doxorubicin-/Perifosinbehandlung in Kombination mit einem Hitzeschock

Die vorangegangenen Versuche haben demonstriert, dass Liposarkom SW872-Zellen mit dem Akt-Inhibitor Perifosin gegenüber einem Hitzeschock sensibilisiert werden. Es ist bekannt, dass die Akt-Hyperaktivierung eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von intrazellulären Resistenzmechanismen in der Therapie von Tumoren einnimmt (Knuefermann et al., 2003; Liang et al., 2003). Daher war es das Ziel dieses Experimentes zu untersuchen, wie Perifosin das Überleben von Sarkomzellen *in vitro* unter einer Doxorubicinbehandlung in Kombination mit einem Hitzeschock beeinflusst.

4.5.1 Analyse der Vitalität von Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen nach einer kombinierten Behandlung aus Doxorubicin, Perifosin und einem Hitzeschock

Um die Vitalität unter der Kombinationsbehandlung bestimmen zu können, wurden die Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen mittels WST-1-Assays analysiert. Die Zellen wurden zehn Stunden mit 5 μ M Perifosin vorbehandelt. Danach erfolgte die Zugabe von Doxorubicin in einer Konzentration, die der Hälfte des ermittelten IC_{50} Wertes ($IC_{50}/2$) entsprach. Der $IC_{50}/2$ für SW872 betrug 2,5 μ M und 5 μ M für MG63. Anschließend wurden die Zellen einem 90-minutigen subletalen Hitzeschock bei 41,8°C unterzogen. Die Zellvitalität wurde 48 Stunden nach dem Hitzeschock mittels WST-1-Assays bestimmt.

Die Analysen der beiden Zelllinien ergaben eine deutliche Verringerung der Zellvitalität bei der Kombinationsbehandlung aus Doxorubicin und Perifosin (**Abb. 4.12**). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen bewirkte eine alleinige Perifosinbehandlung eine 10%-ige Minderung der Vitalität von Liposarkom SW872-Zellen und eine 20% geringere Vitalität bei Zellen, die zusätzlich einem Hitzeschock ausgesetzt waren (**Abb. 4.12 A**). Doxorubicin reduzierte das Überleben auf bis zu 45% und eine zusätzliche Hitzeschockbehandlung um weitere 5%. Eine Kombinationsbehandlung von Perifosin und Doxorubicin erzielte eine Reduktion der Zellvitalität

auf bis zu 30%, der hitzesensibilisierende Effekt war hier allerdings nur gering ausgeprägt.

Osteosarkom MG63-Zellen waren als Folge einer Perifosinbehandlung um ca. 30% und in Kombination mit einer Hitzeschockbehandlung um ca. 40% weniger vital als unbehandelten Kontrollzellen (**Abb. 4.12 B**). Nach der Behandlung mit Doxorubicin zeigte sich ein stark hemmender Effekt auf die Zellvitalität, die auf ca. 40% reduziert wurde. Hier war ebenfalls eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Sensibilisierung durch einen Hitzeschock bezüglich der Zellvitalität nachweisbar. Die Kombination beider Substanzen verstärkte den zytotoxischen Effekt deutlich, sodass bei Osteosarkomzellen nur noch 10% bzw. in Kombination mit Hitze 5% der Vitalität zu bestimmen war.

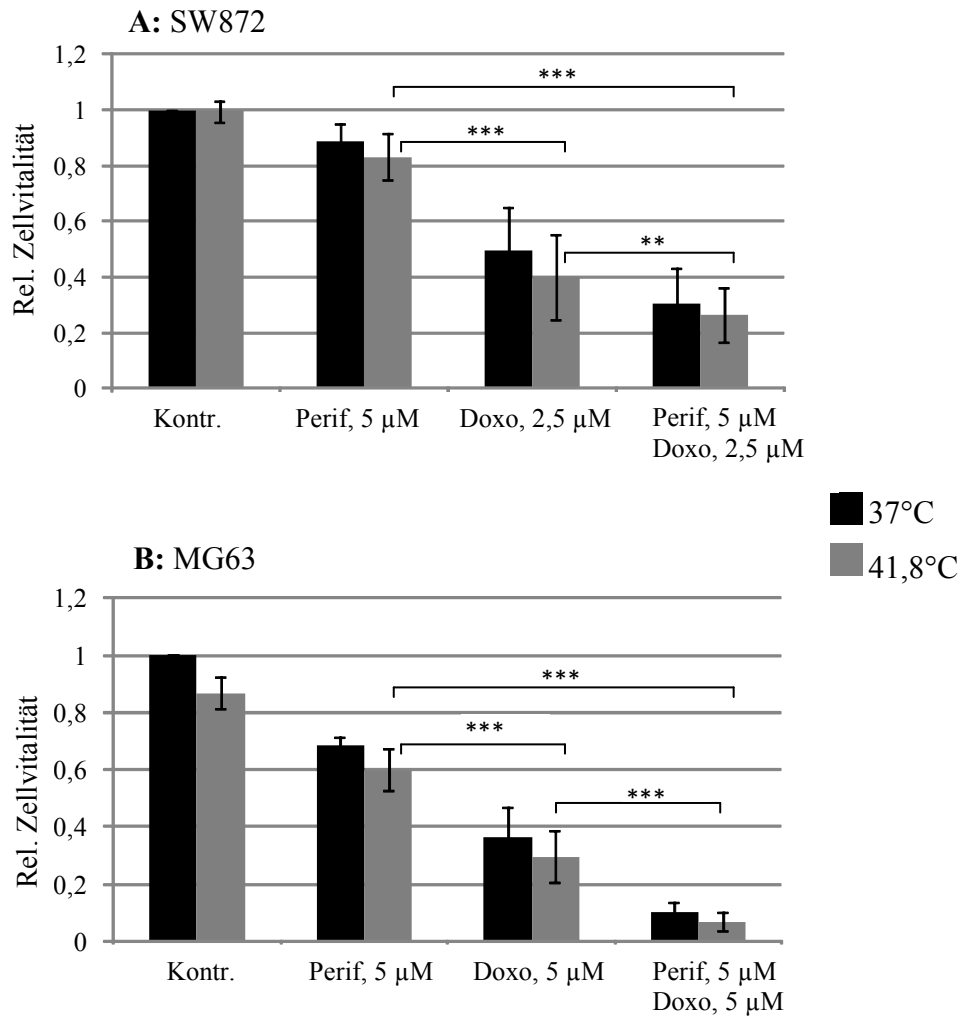


Abb. 4.12 Effekt von Doxorubicin und/oder Perifosin auf die Vitalität der Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen in Kombination mit einem Hitzeschock. Die Liposarkom SW872- (A) und Osteosarkom MG63-Zellen (B) wurden 10 Stunden mit 5 µM Perifosin vorbehandelt. Danach erfolgte die Zugabe von 2,5 µM (SW872) bzw. 5 µM (MG63) Doxorubicin. Anschließend wurden die Zellen einem 90-minütigen Hitzeschock bei 41,8°C unterzogen. Die Vitalität wurde 48 Stunden nach dem Hitzeschock mittels WST-1-Assay bestimmt. Der Kontrollwert wurde auf 1 normiert, n=3.

4.5.2 Analyse von Apoptose-Markern und morphologischen Veränderungen in Sarkomzellen nach einer Kombinationsbehandlung mit Perifosin, Doxorubicin und einem Hitzeschock

Nachdem ein verstärkender Effekt auf die Zelltoxizität bei einer Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Perifosin bei Liposarkom- und Osteosarkomzellen festgestellt werden konnte, wurden Apoptose-Spezifische Veränderungen der Zellen anhand der Morphologie und intrazellulären Markern analysiert.

Dafür wurden die Zellen zehn Stunden mit 5 μM Perifosin vorbehandelt und anschließend wurden die SW872-Zellen mit 2,5 μM und die MG63-Zellen mit 5 μM Doxorubicin versetzt. Unmittelbar danach erfolgte ein 90-minütiger Hitzeschock bei 41,8°C.

Vor der Proteinextraktion, die entweder direkt nach dem Hitzeschock (0 Std.), 24 Stunden (24 Std.) oder 48 Stunden (48 Std.) nach dem Hitzeschock durchgeführt wurde, wurde die Morphologie der behandelten Zellen dokumentiert. Eine alleinige Hitzeexposition führte zu keinen erkennbaren morphologischen Veränderungen und wird im Folgenden nicht dargestellt.

Die Perifosinbehandlung (34 Std. nach der Zugabe), sowie die Doxorubicinbehandlung (24 Std. nach der Zugabe) verursachte sowohl ein Ablösen der Liposarkomzellen, als auch eine deutliche Abnahme der Zelldichte (**Abb. 4.13 B, C**). Dies deutet auf ein Absterben der Zellen unter diesen Bedingungen hin. Die kombinierte Behandlung mit beiden Substanzen verstärkte die oben genannten Effekte deutlich (**Abb. 4.13 D**).

Anders als bei Liposarkomzellen bewirkte Doxorubicin bei Osteosarkomzellen kein Ablösen der Zellen, jedoch eine deutlich geringere Zelldichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abb. 4.13 E, G**). Auch im Verlauf der weiteren Inkubation mit Doxorubicin (bis zu 72 Std.) zeigten sich keinerlei morphologischen Anzeichen für ein Absterben der MG63-Zellen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde aber unter der Behandlung mit Doxorubicin ein angeschwollener Zellkern bei diesen Zellen beobachtet. Perifosin bewirkte hier, ähnlich wie bei Liposarkomzellen, das Ablösen der Zellen (**Abb. 4.13 F**). Die Kombination von Doxorubicin und Perifosin (**Abb. 4.13 H**) verursachte ein stärkeres Absterben der MG63-Zellen, als Perifosin allein. Dabei zeigten sich für die Apoptose typische morphologische Veränderungen, wie etwa das Abrunden und Ablösen der Zellen und *membrane blebbing* (Definition nach Kerr et al., 1972). Um dies zu bestätigen wurden mittels Western Blot die molekularen Apoptose-Marker wie die Aktivierung von Caspase-3 und die Fragmentierung von PARP im Folgenden analysiert.

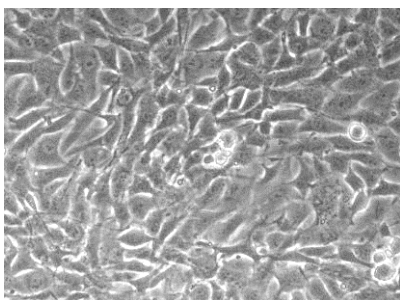
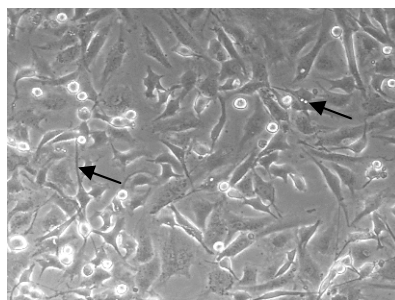
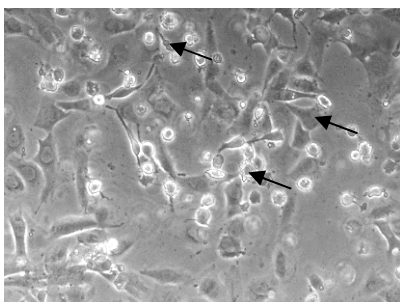
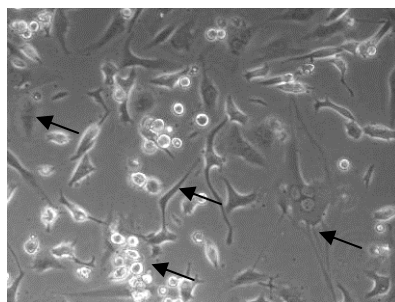
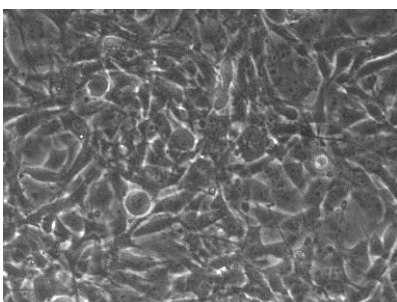
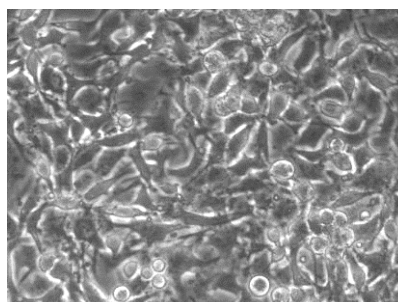
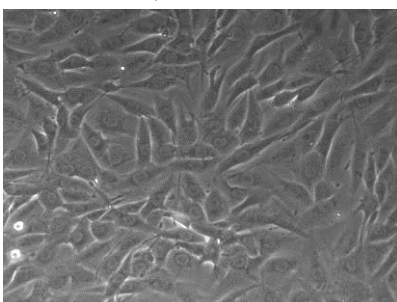
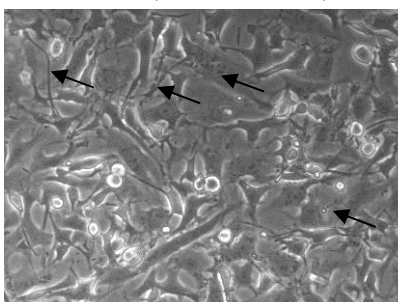
SW872, Liposarkom**A: unbehandelte Kontrolle****B: Perif, 5 μ M****C: Doxo, 2,5 μ M****D: Perif, 5 μ M / Doxo, 2,5 μ M****MG63, Osteosarkom****E: unbehandelte Kontrolle****F: Perif, 5 μ M****G: Doxo, 5 μ M****H: Perif, 5 μ M / Doxo, 5 μ M**

Abb. 4.13 Morphologische Veränderungen von Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen nach der Behandlung mit Perifosin und Doxorubicin. Die SW872- und MG63-Zellen wurden mit 5 μ M Perifosin (**B, F**), 5 μ M (MG63) bzw. 2,5 μ M (SW872) Doxorubicin (**C, G**), oder einer Kombination beider Substanzen (**D, H**) behandelt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop fotografiert (x 20). Es zeigten sich apoptosetypische Veränderungen in der Zellmorphologie wie etwa das Abrunden und Ablösen der Zellen und *membrane blebbing* (Pfeile). Repräsentative Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen, n=5

Die Proteinanalyse der behandelten SW872- und MG63-Zellen hat gezeigt, dass bereits nach einer zehnstündigen Inkubation der Zellen mit 5 μ M Perifosin die Caspase-3 aktiviert und die Fragmentierung von PARPs eingeleitet wurde (**Abb. 4.14 A, B, Spur 2, 6**). Nach einer 90-minütigen Inkubation der Sarkomzellen mit Doxorubicin waren noch keine morphologischen Anzeichen für eine Apoptose festzustellen, jedoch konnte die Induktion der PARP-Expression nach einer Doxorubicinbehandlung bei beiden Sarkomzelllinien deutlich erkannt werden (**Spur 3, 7**). Besonders bei MG63-Zellen war die Induktion der PARP-Expression unter Doxorubicin stark ausgeprägt (**B, Spur 3, 7**). 24 Stunden und 48 Stunden nach dem Hitzeschock zeigte sich, dass sowohl unter der Perifosin- als auch unter der Doxorubicinbehandlung die Fragmentierung von PARP bei SW872-Zellen stattgefunden hat (**A, Spur 2, 3, 6, 7**), während bei diesen Zellen 24 und 48 Stunden nach dem Hitzeschock PARP kaum mehr detektierbar ist, wenn sie mit beiden Substanzen behandelt worden waren. Der Signalverlust deutet auf eine vollständige Degradation des Proteins hin, was auf eine weit fortgeschrittene Apoptose hinweist. Ein anderes Bild zeigte sich bei Osteosarkom MG63-Zellen, die zwar eine Reduktion der Vitalität, aber kein Absterben aufwiesen (**Abb. 4.12, 4.13**). Die Untersuchung der Apoptose-Marker zeigte hier, dass die Induktion der PARP-Expression bei den mit Doxorubicin behandelten MG63-Zellen sowohl bei 37°C als auch 24 und 48 Stunden nach einem Hitzeschock erhalten blieb (**B, Spur 3, 7**). Die Behandlung der MG63-Zellen mit Perifosin löste eine Fragmentierung von PARP aus, wobei die Kombination mit einem Hitzeschock zu einer Verstärkung dieses Effekts führte (**B, Spur 2, 6**). Die kombinierte Behandlung der MG63-Zellen mit Doxorubicin und Perifosin zeigte eine deutliche Reduktion der PARP-Expression nach 24 Std. und eine vollständige Fragmentierung nach einer 48-stündigen Inkubation (**B, Spur 4, 8**).

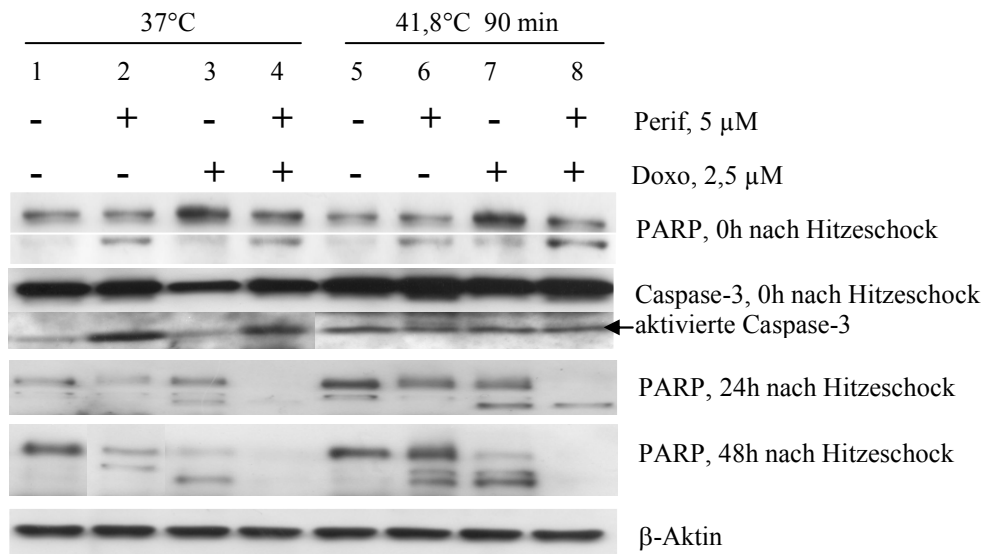
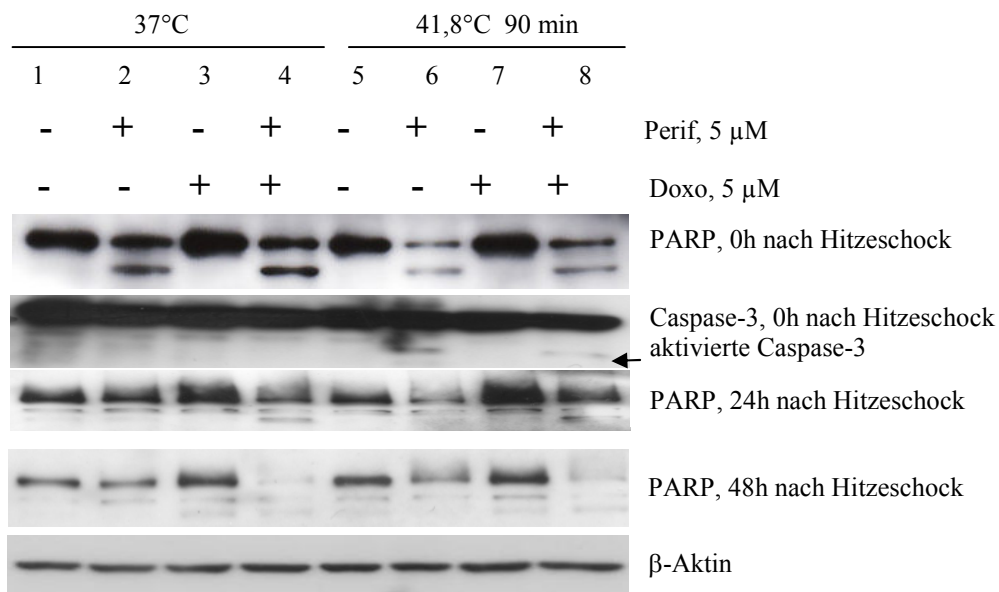
A: SW872**B: MG63**

Abb. 4.14 Effekt der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin, Hitze und Perifosin auf PARP und Caspase-3 in Liposarkom SW872- und Osteosarkom MG63-Zellen. Die SW872- (A) und MG63-Zellen (B) wurden 10 Stunden mit 5 µM Perifosin vorbehandelt. Danach erfolgten die Zugabe von 2,5 µM (SW872) bzw. 5 µM Doxorubicin (MG63) und ein 90-minütiger subletaler Hitzeschock bei 41,8°C. Die Proben für die Proteinanalyse wurden unmittelbar nach dem Hitzeschock (0 Std.), 24 Stunden (24 Std.) und 48 Stunden (48 Std.) nach dem Hitzeschock geerntet. Die Detektion von PARP-Fragmenten und der geschnittenen Caspase-3 erfolgte mittels Western Blot. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

Die Ergebnisse deuten auf eine Perifosin-vermittelte Verstärkung der apoptotischen Prozesse nach der Behandlung mit Doxorubicin hin. Eine zusätzliche Hitzeexposition kann zu einer weiteren Verstärkung der apoptotischen Zellantwort führen.

4.6 Der Einfluss von Perifosin auf die Sensitivität der Fibrosarkom HT1080-Zellen gegenüber Doxorubicin

Die Erkenntnisse vorheriger Experimente an MG63-Zellen lassen darauf schließen, dass Perifosin deren relative Doxorubicin-Resistenz aufheben kann. Um diese Aussage zu validieren, wurden Experimente mit der HT1080-Zelllinie durchgeführt, die in der Literatur als wenig sensitiv gegenüber Topoisomerase-II Inhibitoren wie Doxorubicin und Etoposid beschrieben wurde (Zwelling et al., 1990). Da die Akt-Hyperaktivierung eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenz-Mechanismen bei Tumorthérapien einnimmt (Knuefermann et al., 2003; Liang et al., 2003), war es das Ziel dieser experimentellen Untersuchung zu überprüfen, ob Perifosin die zytotoxische Wirksamkeit von Doxorubicin in HT1080-Zellen verstärken kann.

4.6.1 Bestimmung der Zellvitalität nach einer kombinierten Behandlung aus Doxorubicin und Perifosin

Für die Vitalitätsanalyse wurden die Fibrosarkom HT1080-Zellen mit steigenden Doxorubicin-Konzentrationen (0-100 μM) mit oder ohne Zugabe von 5 μM Perifosin behandelt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C wurde die metabolische Aktivität der Zellen mittels WST-1-Assays ermittelt. Die Zellen zeigten eine signifikante Verringerung der Überlebensrate durch die Kombinationsbehandlung von Doxorubicin und Perifosin im Vergleich zu einer Behandlung mit Doxorubicin oder Perifosin allein. So lag die bei diesem Experiment ermittelte IC_{50} -Dosis von Doxorubicin bei 75 μM , während bei gleichzeitiger Behandlung mit 5 μM Perifosin die IC_{50} -Dosis auf 5 μM absank (**Abb. 4.15**).

Die Daten bestätigen, dass durch Perifosin eine Doxorubicin-Resistenz aufgehoben werden kann.

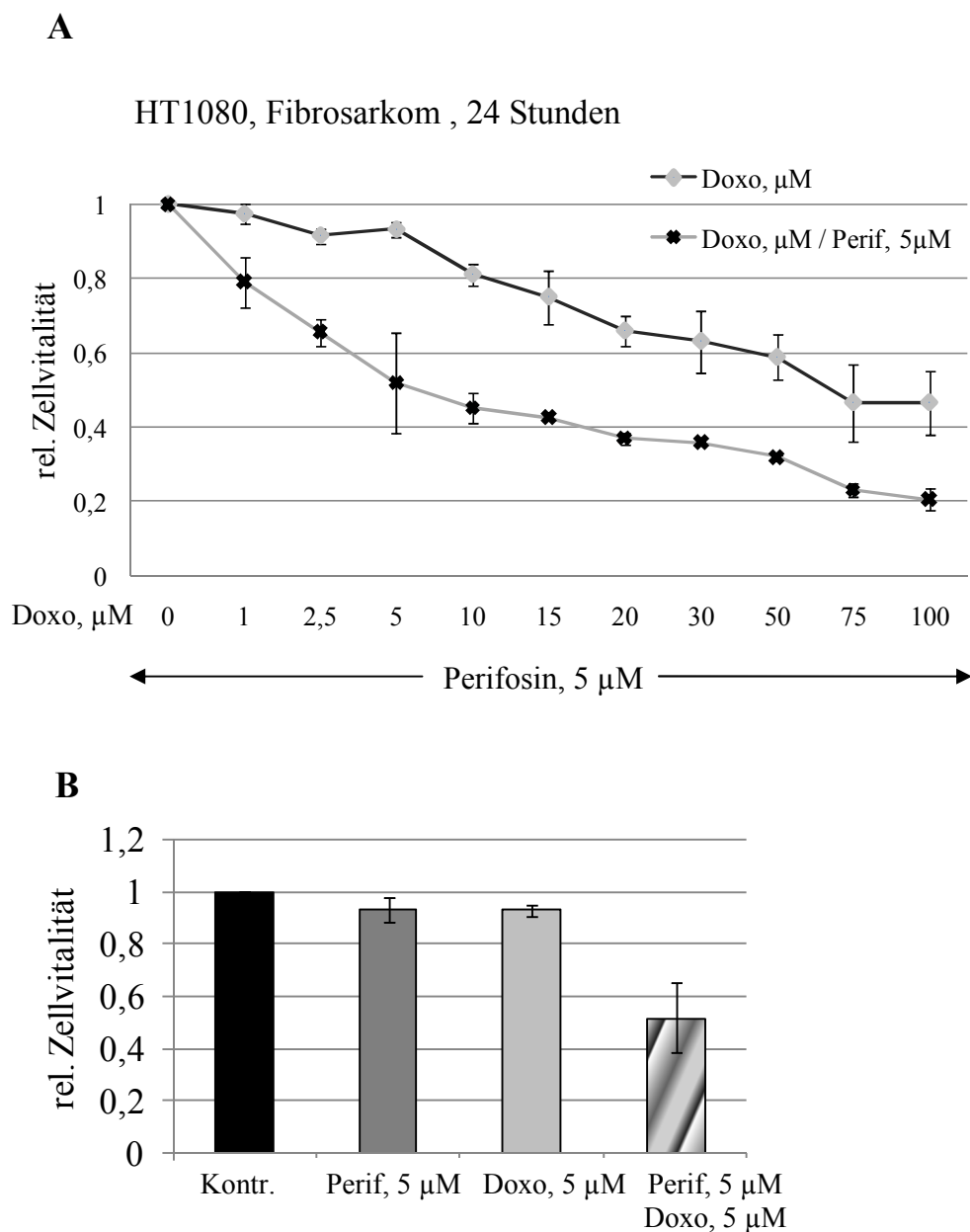


Abb. 4.15 Vitalität der Fibrosarkom HT1080-Zellen nach der Behandlung mit Doxorubicin in Kombination mit 5 µM Perifosin. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit 5 µM Perifosin und steigenden Konzentrationen von Doxorubicin (0-100 µM) wurde die Zellvitalität mittels WST-1-Assays bestimmt. Der Kontrollwert, ausgehend von drei unabhängigen Versuchen, wurde auf 1 normiert, n=3 (A). Die Effekte der Einzel- und Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu den Kontrollwerten wurden in Diagramm B dargestellt, n=3.

4.6.2 Analyse der pro- und anti-apoptotischen Merkmale nach einer Behandlung von Fibrosarkom HT1080-Zellen mit Perifosin und Doxorubicin

Nachdem Perifosin einen verstärkenden Effekt auf die Doxorubicin-vermittelte Toxizität bei der Kombinationsbehandlung der HT1080-Zellen zeigte, stand es im Fokus des folgenden Experimentes, den Phosphorylierungsstatus der anti-apoptotischen Proteinkinase Akt und Erk1/2 MAP Kinasen sowie die Apoptose-Marker PARP und Caspase-3 zu untersuchen. Zusätzlich wurde der Expressionslevel von HSP70 unter der Einwirkung von Doxorubicin und Perifosin untersucht, da das Protein in die Entwicklung von Chemo- und Radioresistenz-Mechanismen involviert ist und seine Überexpression oft mit Chemo- und Radioresistenz assoziiert ist (Grivicich et al., 2007).

Für die Proteinanalyse mittels Western Blot wurden die HT1080-Zellen 24 Stunden mit 5 μ M Doxorubicin und/oder 5 μ M Perifosin behandelt und anschließend geerntet.

Nach einer 24-stündigen Behandlung der HT1080-Zellen mit Perifosin wurde eine fast vollständige Inhibition der Phosphorylierung von Akt erreicht (Akt-Thr308 und -Ser473), während die exprimierte Gesamtmenge des Akt-Proteins unverändert blieb. Eine Doxorubicinbehandlung dagegen führte zu einer starken Phosphorylierung beider Phosphorylierungsstellen dieses Proteins. Durch eine zeitgleiche Gabe von Perifosin wurde die durch Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung von Akt deutlich gemindert. Die Gesamtmenge des Akt-Proteins blieb auch unter diesen Bedingungen unverändert. Doxorubicin bewirkte eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der Erk1/2 MAP Kinasen, die unter einer Perifosinbehandlung weiter verstärkt wurde. Unter dem Einfluss von Perifosin konnte eine leichte Unterdrückung des in den Sarkomzellen konstitutiv exprimiertem HSP70 erkannt werden. Interessanterweise stieg die HSP70-Expression unter Doxorubicin leicht an, wobei dieser Anstieg bei einer gleichzeitigen Behandlung mit Perifosin verringert wurde (**Abb. 4.16 links**).

Bei der Detektion der Apoptose-Marker Caspase-3 und PARP konnte festgestellt werden, dass sowohl eine Perifosin- als auch eine Doxorubicinbehandlung allein zur PARP-Fragmentierung führten. Wie bei MG63- und SW872-Zellen (**Abb. 4.14**) konnte auch bei HT1080-Zellen die Doxorubicin-vermittelte Induktion der PARP-Expression festgestellt werden. Das Protein wird hier (ähnlich wie bei SW872-Zellen) als Folge der Aktivierung des apoptotischen Programs geschnitten. Die

Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen verstärkte die Aktivierung der Caspase-3 und die Fragmentierung von PARP deutlich (**Abb. 4.16**). Dies lässt auf eine signifikante Verstärkung der Apoptoseinduktion unter der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Perifosin schließen. Hier konnte allerdings keine Perifosin-vermittelte Reduktion der PARP-Expression festgestellt werden.

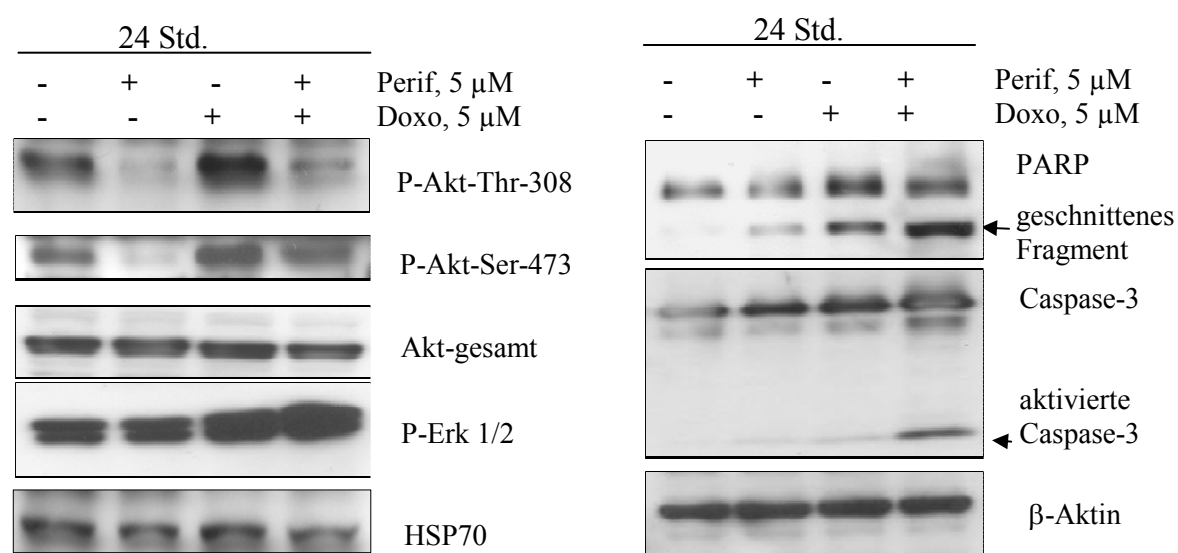


Abb. 4.16 Der Effekt der Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin und Perifosin auf pro- und anti-apoptotische Faktoren in Fibrosarkom HT1080-Zellen. Die HT1080-Zellen wurden 24 Stunden mit 5 μ M Doxorubicin, 5 μ M Perifosin oder in einer Kombination der beiden Wirkstoffe inkubiert. Die anschließende Detektion von Phospho-Akt, Phospho-ERK1/2, der Expressionslevel von HSP70, der proteolytisch aktivierten Caspase-3 sowie die PARP-Fragmentierung erfolgte mittels Western Blot Analyse. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

Die morphologischen Veränderungen der HT1080-Zellen bestätigen, dass eine zeitgleiche Behandlung mit Doxorubicin und Perifosin zur einer stärkeren Abnahme der Zelldichte führte (**Abb. 4.17 D**) als bei Einzelbehandlungen (**Abb. 4.17 B, C**).

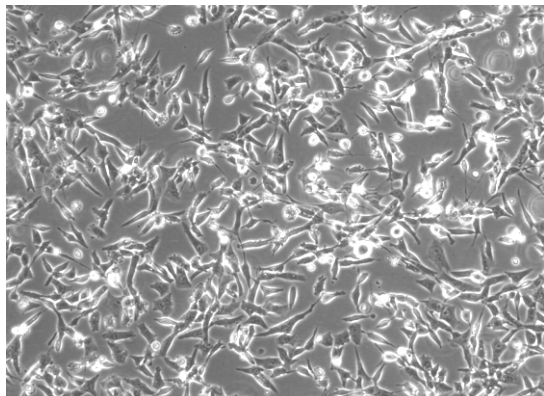
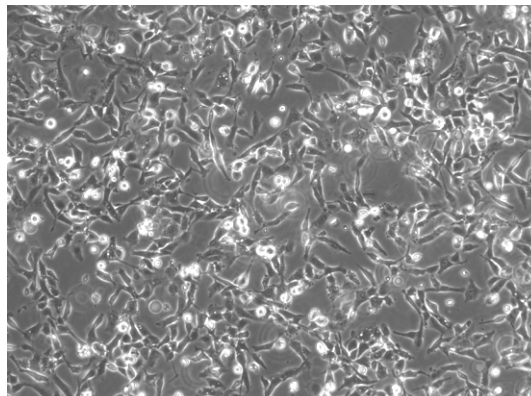
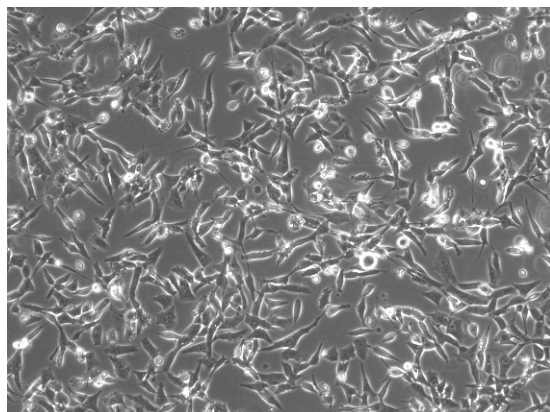
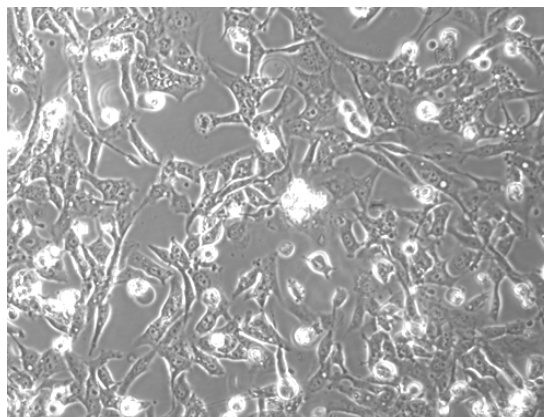
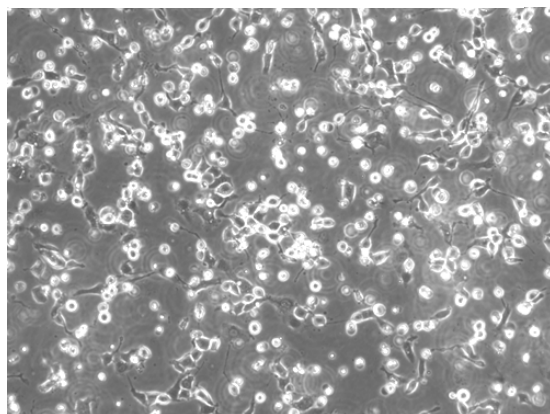
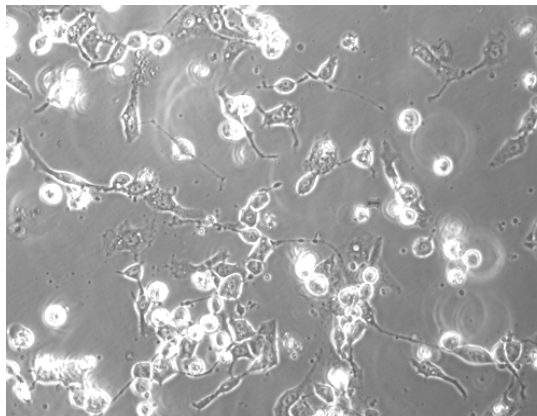
A: unbehandelte Kontrolle**B:** Perif, 5 μ M**C1:** Doxo, 5 μ M**C2:** Doxo, 5 μ M**D1:** Perif, 5 μ M / Doxo, 5 μ M**D2:** Perif, 5 μ M / Doxo, 5 μ M

Abb. 4.17 Morphologische Veränderungen von Fibrosarkom HT1080-Zellen unter der Behandlung mit Doxorubicin und Perifosin. Die Fibrosarkom HT1080-Zellen wurden nicht behandelt (**A**, x10), oder behandelt mit 5 μ M Perifosin (**B**, x10), mit 5 μ M Doxorubicin (**C1**, x10 und **C2**, x20) oder mit 5 μ M Doxorubicin und 5 μ M Perifosin (**D1**, x10 und **D2**, x20). Die Lichtmikroskopischen Aufnahmen erfolgten 24 Std. nach den Behandlungen, n=3.

4.7 Untersuchung zur physiologischen Rolle des Akt-Proteins in Liposarkom SW872-Zellen mittels RNA-Interferenz

In vorangegangenen Experimenten wurde beobachtet, dass ein Hitzeschock oder eine Doxorubicinbehandlung zu einer starken Akt-Phosphorylierung führten. Ebenso wurde gezeigt, dass Perifosin die Tumorzellen gegenüber einer Hitzeschock- bzw. Doxorubicinbehandlung sensibilisiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Akt das Überleben der Zellen bei diesen Behandlungen fördert. Hierbei stellt sich die Frage, ob es durch eine Inhibition der Akt-Aktivierung durch Perifosin zu einer Reduktion der Zellvitalität kommt, oder ob Perifosin unspezifisch über andere Zielproteine einen Einfluss auf den Zelltod bzw. auf das Überleben der Zellen hat. Obwohl in zahlreichen Literaturquellen Perifosin als ein spezifischer Akt-Inhibitor bezeichnet wird (Patel et al., 2002; Gills und Dennis, 2010), wurde *in vitro* gezeigt, dass die Aktivität einiger anderer in Signaltransduktionswege involvierter Proteine durch Perifosin moduliert werden kann. In diesem experimentellen Ansatz wurde die RNA-Interferenz-Technologie eingesetzt, um eine präzise und spezifische Unterdrückung der Synthese von Akt zu erreichen und dadurch spezifisch Akt-abhängige Prozesse zu untersuchen. Dank dieser Methode können die Effekte, die auf eine unspezifische Wirkung von Perifosin hindeuten, identifiziert bzw. ausgeschlossen werden.

Da von Akt drei Isoformen existieren (Akt1, Akt2 und Akt3), wurde gegen jede der Isoformen eine spezifische siRNA durch eine adenoviral vermittelte transiente Transfektion in die Zellen eingebracht, um die gesamte endogene Akt-Proteinsynthese in den Zellen zu unterdrücken.

4.7.1 Effizienz und Selektivität der unterdrückten Proteinsynthese von Akt-Isoformen

Die Effizienz der Unterdrückung aller drei Isoformen von Akt in den Liposarkom SW872-Zellen wurde im Western Blot Verfahren bestätigt. Das Ergebnis zeigt, dass unter normalen Bedingungen alle drei Isoformen von Akt in den Zellen exprimiert werden (**Abb. 4.18 A, B, C**). Nach einer 72-stündigen Inkubation mit den siRNAs wurde eine effektive Unterdrückung der einzelnen Isoformen und der gesamten Menge des Akt-Proteins erreicht (**Abb. 4.18 A-D**).

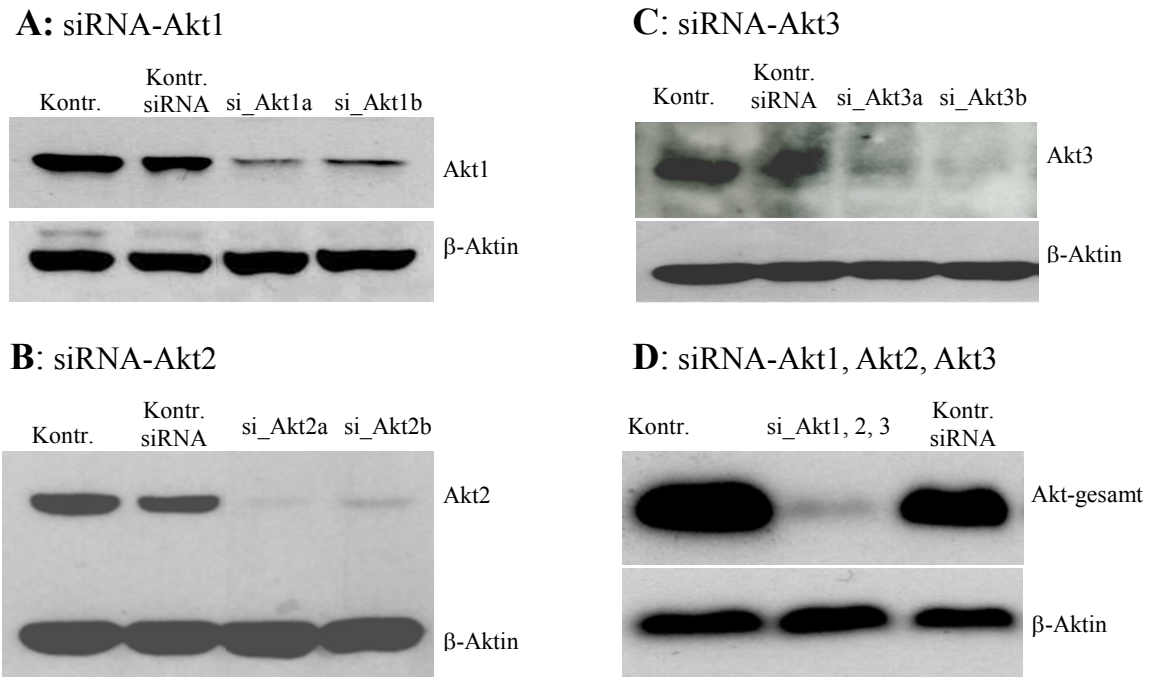


Abb. 4.18 siRNA-vermittelte Unterdrückung von Akt-Isoformen. 72 Stunden nach der adenoviralen transienten Transfektion mit den siRNAs gegen Akt-1 (A), Akt-2 (B), Akt-3 (C) und aller drei Isoformen zusammen (D) bzw. unspezifischen siRNAs in die SW872-Zellen wurden Proteinextrakte gewonnen und mittels Western Blot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen, n=3.

4.7.2 Der Effekt eines Akt-Knock-Downs und eines Hitzeschocks bei 41,8°C auf downstream targets von Akt

In vorherigen Experimenten wurde bei verschiedenen Zelllinien dokumentiert, dass ein Hitzeschock bei 41,8°C die Phosphorylierung von Akt und der nachfolgenden Proteine mTOR und p70/p85 S6K induziert. In diesem Experiment sollte an SW872-Zellen untersucht werden, ob durch einen Akt-KD mit oder ohne Perifosinbehandlung die Hitzeschock-induzierten Phosphorylierungen von stromabwärts von Akt gelegenen Proteinen der Akt-Signalkaskade verringert werden können.

Die Zellen wurden mit siRNAs gegen Akt-1, -2 und -3 transient transfiziert und 90 Std. bei 37°C inkubiert. Als Vergleich wurde eine Probe verarbeitet, bei der parallel zur siRNA-vermittelten Akt-Unterdrückung Perifosin zugegeben wurde. Somit sollte dessen Wirkung auf Zellen untersucht werden, bei denen das eigentliche Zielprotein fehlt. Die schematische Darstellung von Ablauf dieses Experiments ist in **Abb. 4.19** dargestellt.

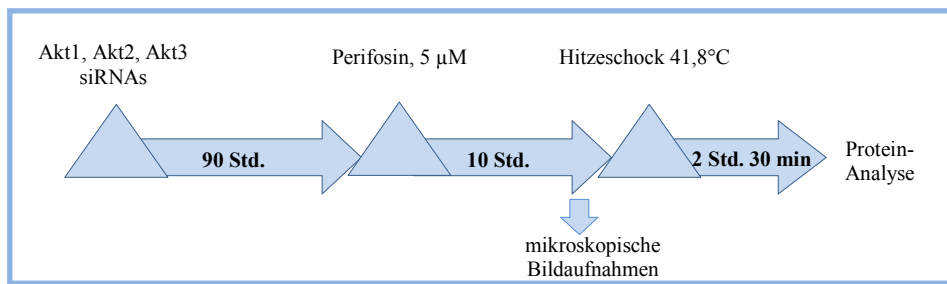


Abb. 4.19 Schematische Darstellung des Akt-siRNA-Experimentes. 90 Stunden nach der Behandlung der SW872-Zellen mit den entsprechenden siRNAs wurden 5 µM Perifosin zugegeben und die Zellen wurden für weitere zehn Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die morphologischen Veränderungen der Zellen mittels mikroskopischen Aufnahmen dokumentiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 2 Std. und 30 min einem Hitzeschock bei 41,8°C ausgesetzt und anschließend für die Proteinextraktion geerntet.

Die Untersuchung der Phosphorylierungen von mTOR am Ser2448 (Akt-abhängige Phosphorylierung) sowie am Ser2481 (Autophosphorylierung) und des nachfolgenden Proteins p70/p85 S6K am Thr389/Thr412 zeigt eine Reduzierung der Phosphorylierungen bei einem Akt-KD (**Abb. 4.20 Spur 3**) und unter dem Akt-KD mit zusätzlicher Perifosinbehandlung (**Abb. 4.20 Spur 4**). Die durch einen Hitzeschock induzierten aktivierenden Phosphorylierungen von mTOR und p70/p85 S6K (**Abb. 4.20 Spur 5 und 6**) wurden ebenso sowohl durch den Akt-KD, als auch durch den Akt-KD mit zusätzlichem Perifosin deutlich vermindert (**Abb.4.20 Line 7 und 8**).

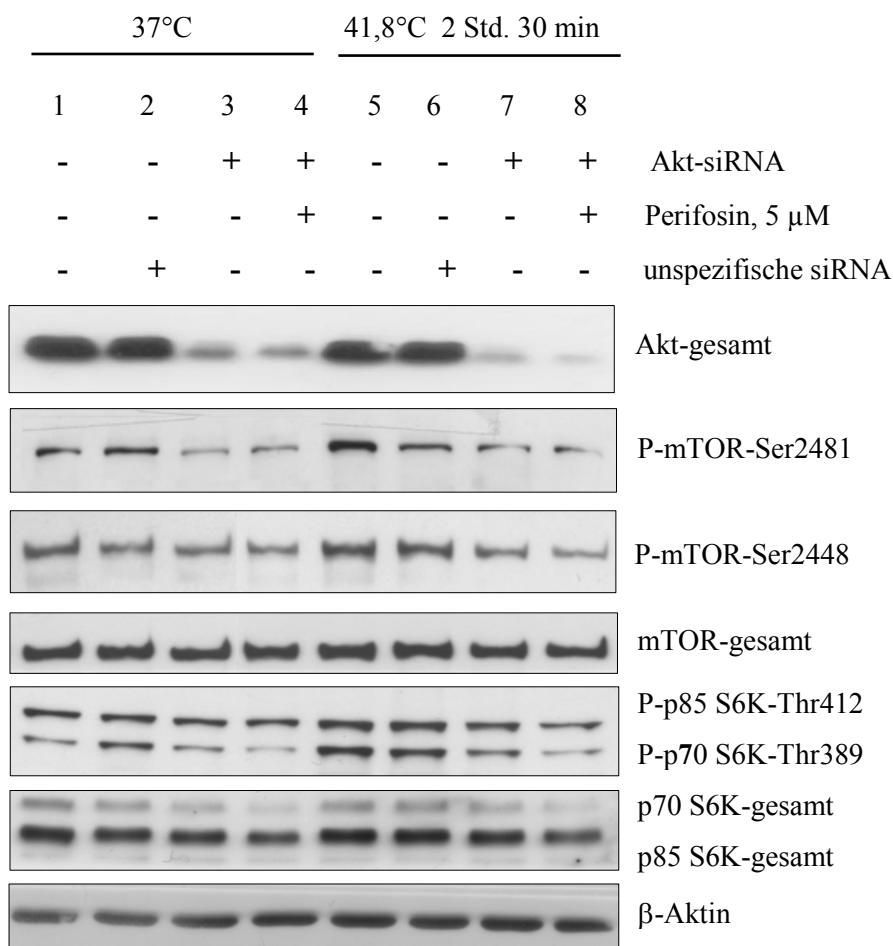


Abb. 4.20 Phosphorylierungsstatus von mTOR und p70/p85 S6K bei einem Akt-*Knock-Down* mit oder ohne Perifosinbehandlung und Hitzeschock. Nach einer 90-stündigen Inkubation der Liposarkom SW872-Zellen mit siRNAs gegen Akt-1, -2 und -3 erfolgte die Zugabe von 5 µM Perifosin für 10 Stunden. Danach wurden die Zellen für 2 Std. und 30 min einem Hitzeschock bei 41,8°C unterzogen und anschließend für die Proteinextraktion geerntet. β-Aktin diente als Ladekontrolle, n=5.

Die densitometrische Auswertung der Phosphorylierungen (**Abb 4.21**) zeigt, dass sowohl die konstitutive, als auch die hitzeinduzierte Phosphorylierung von mTOR oder p70/p85 S6K durch einen Akt-KD reduziert wurden. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Perifosin bedingte eine weitere Senkung der Phosphorylierung. Dies kann durch einen unvollständigen AKT-KD und eine komplementäre Akt Inhibition durch Perifosin erklärt werden.

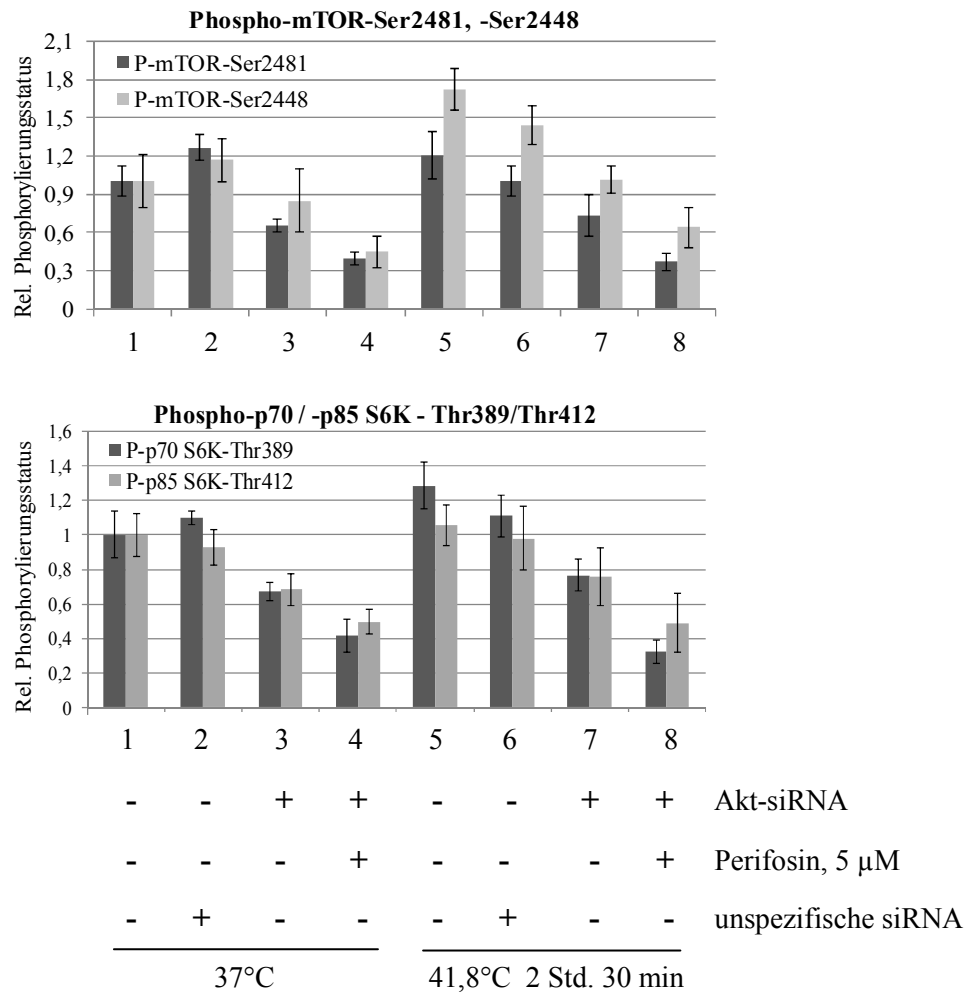


Abb. 4.21 Densitometrische Auswertung der phosphorylierten Formen von mTOR und p70/p85 S6K bei einem Akt-Knock-Down und einem Hitzeschock. Die Intensitäten der spezifischen Signale im Western Blot (Abb. 4.19) wurden mit dem Programm ImageJ analysiert und der Quotient aus der Intensität der Phosphorylierung und dem Haushaltsprotein β -Aktin gebildet. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Messwerte auf die Kontrolle relativiert, n=5.

4.7.3 Auswirkungen eines Akt-Knock-Downs auf den Expressionslevel von Hitzeschockproteinen während eines Hitzeschocks in Liposarkom SW872-Zellen

In bisherigen Publikationen wurde beschrieben, dass es einen engen Zusammenhang zwischen dem Pi3K-Akt-Signalweg und den Hitzeschockproteinen HSP27, HSP70 und HSP90 gibt (Mustafi et al., 2010; Rane et al., 2003; Ying Qu et al., 2009). Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob ein Akt-KD in Liposarkom SW872-Zellen eine Auswirkung auf den Expressionslevel bzw. auf die durch einen Hitzeschock induzierte

Hochregulation von HSP27, HSP70 und HSP90 hat. In der Auswertung wurde ebenfalls die konstitutiv exprimierte Form HSC70 berücksichtigt, da diese mit dem Pi3K-Akt-Signalweg interagiert und für die Akt-Aktivität essentiell ist (Shioto et al., 2010).

Die durch den Western Blot bestimmte Expressionsmenge von HSP27 (**Abb. 4.22 A**) zeigte keine hitzeabhängige Induktion direkt nach einer zweieinhalb-stündigen Behandlung bei 41,8°C. Es konnte ebenso keine Veränderung der HSP27-Expression durch einen Akt-KD festgestellt werden.

Dagegen wurde die Expression von HSP70 innerhalb des zweieinhalb-stündigen Hitzeschocks hochreguliert (**Abb. 4.22 A, Spur 5 und 6; Abb. 4.22 B**). Zellen mit einem Akt-KD zeigten unter Hitzeschock-Bedingungen ein geringeres Ausmaß der HSP70-Induktion (**Abb. 4.22 A, Spur 7 und 8; Abb. 4.22 B**) im Vergleich zu Proben mit intaktem Akt. Ähnlich wie bei hitzeexponierten Zellen, beeinflusste der Akt-KD ebenfalls die HSP70-Expression in den Kontrollzellen bei 37°C. Der Expressionslevel von konstitutiv exprimiertem HSC70 blieb allerdings bei allen Proben konstant.

Sowie HSP70, wurde auch die HSP90-Expression während einer zweieinhalb-stündigen Hitzeschockbehandlung induziert (**Abb. 4.22 A Spur 5 und 6**). Anders jedoch als bei HSP70, zeigte der Akt-KD auf die HSP90-Induktion keine Auswirkung (**Abb. 4.22 A Spur 7 und 8**). Die Ergebnisse weisen auf eine bedeutende Rolle von Akt in der Regulation der hitzeinduzierten HSP70-Expression hin.

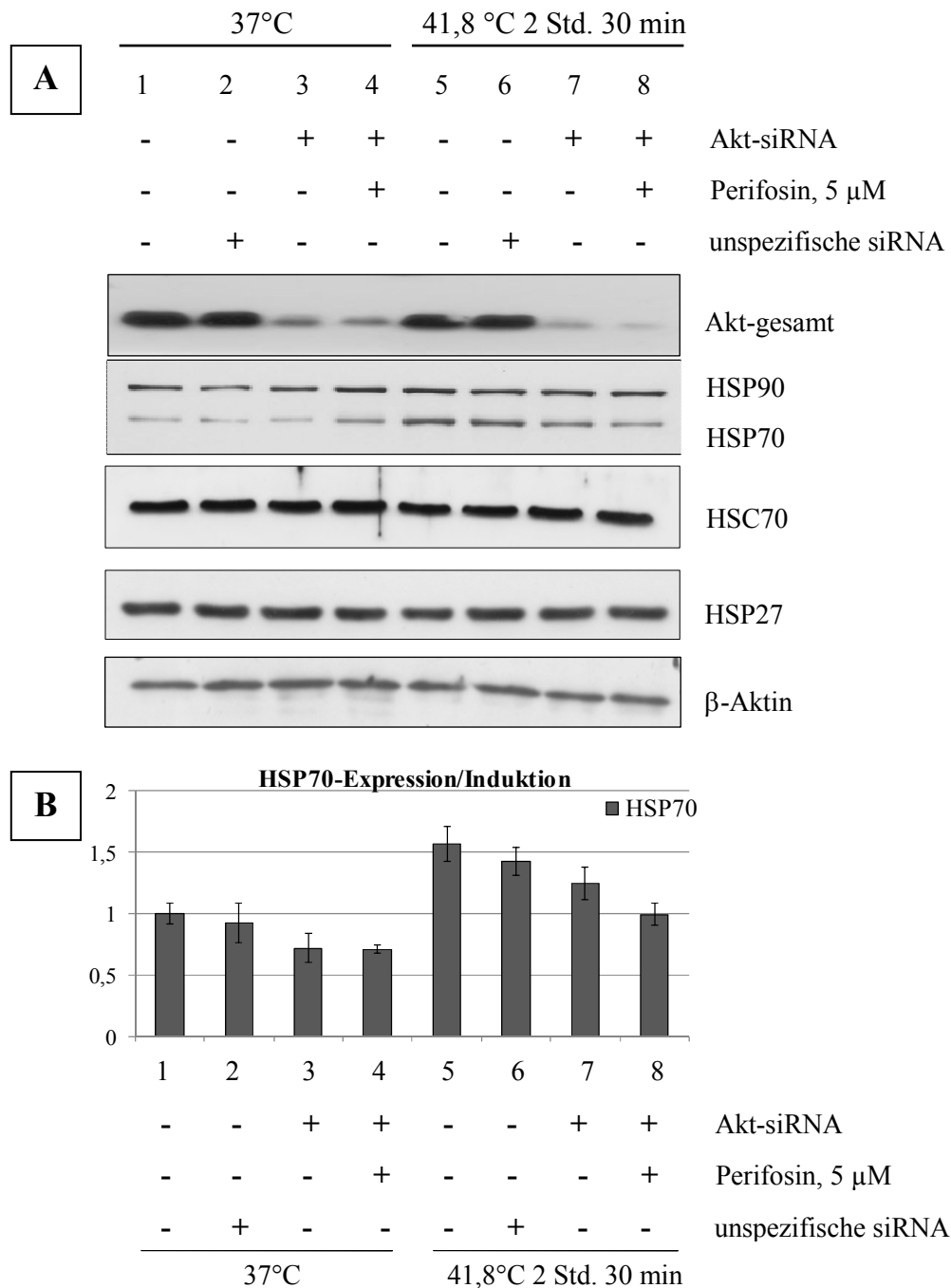


Abb. 4.22 Einfluss des Akt-Knock-Downs auf das Expressionsprofil der Hitzeschockproteine nach einem Hitzeschock bei 41,8°C. Die SW872-Zellen wurden mit adenoviral transfizierten siRNAs, die gegen Akt-1, -2 und -3 gerichtet waren, inkubiert. Nach einer 90-stündigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von 5 µM Perifosin und eine weitere Inkubation bei 37°C für 10 Stunden. Danach wurden die Zellen einem zweieinhalbstündigen Hitzeschock bei 41,8°C ausgesetzt und anschließend für die Proteinextraktion geerntet. Der Expressionslevel der Hitzeschockproteine wurde mittels Western Blot bestimmt. β-Aktin diente als Ladekontrolle, n=5 (A). (B) Densitometrische Auswertung der HSP70-Expression ermittelt in Western Blots. Die Intensitäten der HSP70-Banden wurden mit dem Programm ImageJ analysiert. Die Kontrollwerte wurden auf 1 normiert und die Messwerte auf die Kontrolle relativiert, n=3.

4.7.4 Einfluss des Akt-Knock-Downs und eines Hitzeschocks bei 41,8°C auf GSK3 α/β sowie auf Erk1/2 und p38 MAP Kinasen

In bisher publizierten Arbeiten wurde *in vitro* gezeigt, dass unter dem Einfluss von Perifosin verschiedene Kinasen aktiviert werden, wie z.B. die p38-MAP Kinase, die in der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle spielt (Li, 2006), oder die Erk1/2 MAP Kinasen (Steelmann, 2004). Durch das selektive siRNA-vermittelte Unterdrücken der Proteinsynthese von Akt wurde unter Hitzeschock-Bedingungen untersucht, ob die fehlende Funktion von Akt oder die Wirkung von Perifosin zu Änderungen des Phosphostatus der p38 und ERK1/2 MAP Kinasen in SW872-Zellen führt.

Interessanterweise können sowohl die MAP Kinasen p38 und ERK1/2 als auch die von Akt gesteuerte GSK3 α/β in die Regulation der Expression bzw. der Induktion von HSP70 involviert werden (He et al., 1998; Mustafi et al., 2010; Wang et al., 2003). Somit repräsentieren die Kinasen wichtige Regulationsfaktoren in den hitzeassoziierten zellulären Antworten und wurden in diesem Experiment ebenfalls untersucht.

Die in der Regulation des Zellmetabolismus involvierte GSK3 α/β wird in der Regel von Akt inhibitorisch phosphoryliert (Manning und Cantley, 2007). Die Phosphorylierung von GSK3 α/β stieg bei einer alleinigen Hitzeschockbehandlung leicht an (**Abb. 4.23, 4.24 Spur 5 und 6**). In diesem Experiment nahm interessanterweise der Phosphorylierungsstatus der GSK3 α/β während eines Akt-KDs stark zu (**Abb. 4.23, 4.24 Spur 3 und 4**) und dieser Effekt wurde durch eine zusätzliche Hitzeschockbehandlung weiter verstärkt (**Abb. 4.23, 4.24 Spur 7 und 8**), was auf einen alternativen Akt-unabhängigen Mechanismus hindeuten kann.

Die Western Blot Analyse der Phospho-p38-Thr180/Tyr182 und Phospho-Erk1/2-Thr202/Tyr204 zeigte im Vergleich zur Kontrolle (**Spur 1 und 2**) eine starke Anreicherung der phosphorylierten Formen in den Zellen, die mit den Akt-siRNAs behandelt wurden (**Abb. 4.23, 4.24, Spur 3 und 4**). Die Hitzeexposition von Liposarkomzellen löste eine ebenso starke Induktion der Phosphorylierungen von p38 und Erk1/2 aus (**Spur 5 und 6**). Die Kombination der beiden Behandlungen, also Akt-siRNAs und Hitzeschock, führte zu einer Vervielfachung dieser Induktion (**Spur 7 und 8**). Hierbei blieb die exprimierte Gesamtmenge dieser Proteine in den Zellen während der angegebenen Behandlungen unverändert.

Bei einem Akt-KD wurden die Phosphorylierungen der untersuchten Kinasen durch eine zusätzliche Perifosinbehandlung nicht beeinflusst. Die Daten deuten darauf hin, dass die Aktivierung von p38 und Erk1/2 einerseits durch einen subletalen Hitzeschock bei 41,8°C und andererseits durch den Mangel von Akt induziert wurde.

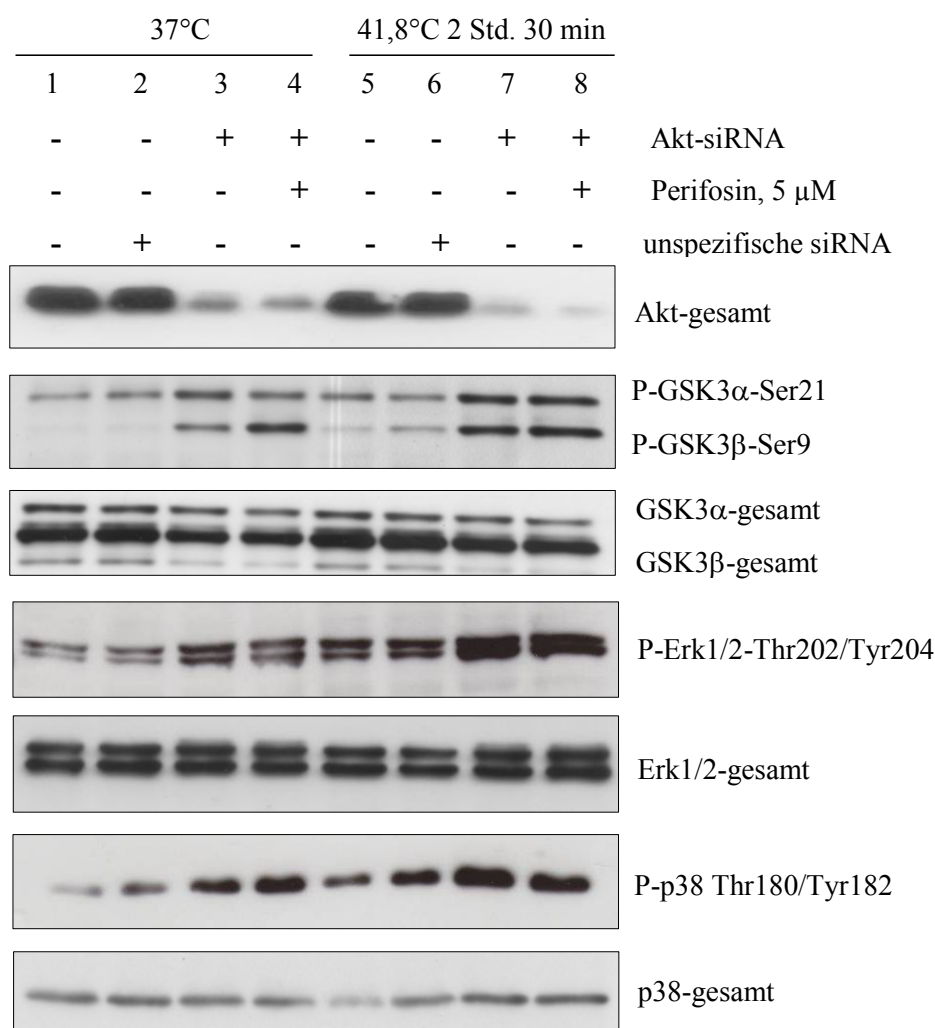


Abb. 4.23 Einfluss eines Hitzeschocks bei 41,8°C und Perifosin auf die GSK3α/β sowie auf Erk1/2 und p38 MAP Kinasen in Akt-defizienten Zellen. Die Akt-1, -2 und -3 SW872- KD-Zellen wurden mit 5 µM Perifosin behandelt und für 2 Std. und 30 min einem Hitzeschock unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für die Gewinnung der Proteinextrakte geerntet. Der Phosphorylierungsstatus, sowie die exprimierte Menge der GSK3α/β, p38 und Erk1/2 MAP Kinasen wurden mittels Western Blot bestimmt, n=5.

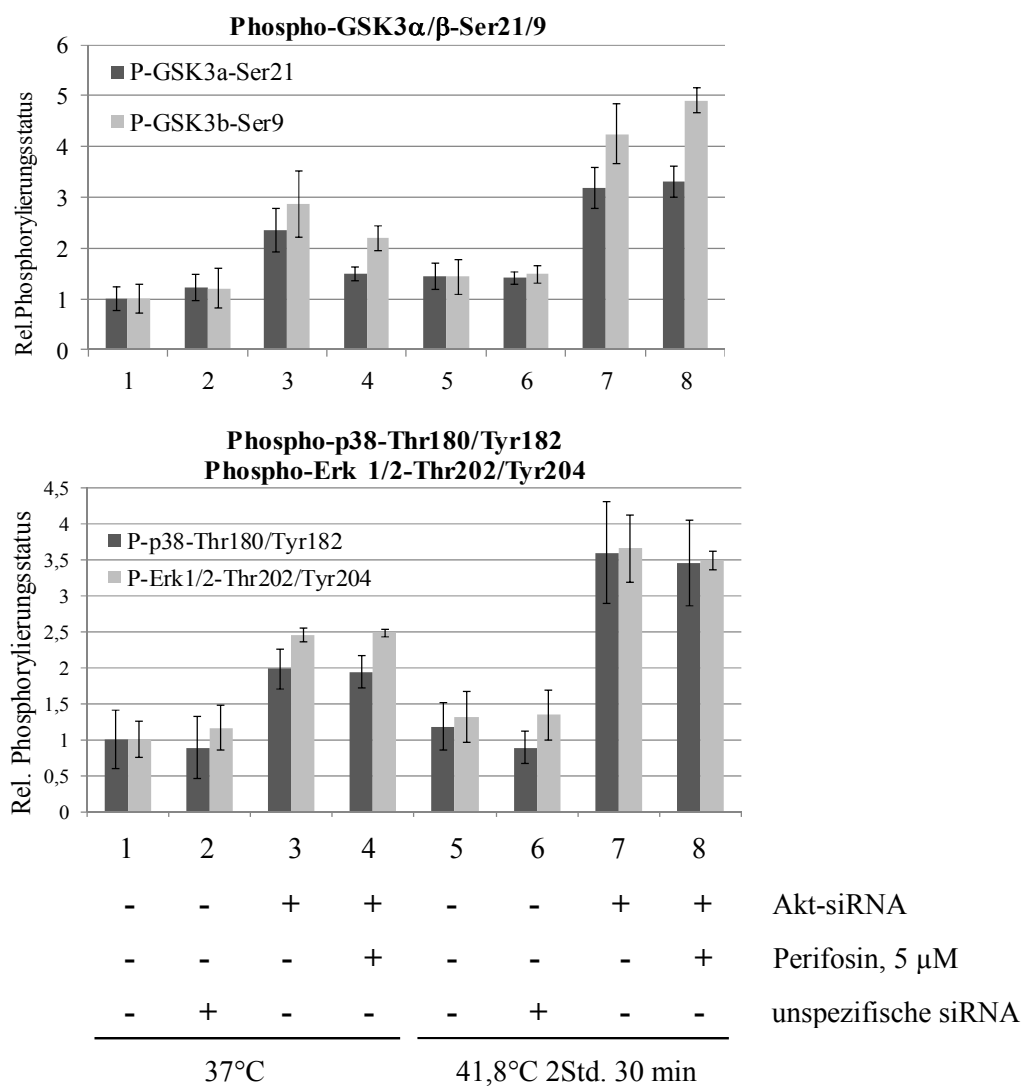


Abb. 4.24 Densitometrische Auswertung der phosphorylierten Formen von GSK3 α / β sowie Erk1/2 und p38 MAP Kinasen bei einem Akt-*Knock-Down* und einem Hitzeschock. Die Intensitäten der spezifischen Signale im Western Blot (**Abb. 4.22**) wurden mit dem Programm ImageJ analysiert und der Quotient aus der Intensität der Phosphorylierung und dem Haushaltsprotein β -Aktin gebildet. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt und die Messwerte auf die Kontrolle relativiert, n=5.

4.7.5 Untersuchungen zu apoptotischen Veränderungen in den Akt-Knock-Down-Zellen nach einem Hitzeschock und einer Perifosinbehandlung

Akt fördert über verschiedene direkte und indirekte Mechanismen das Zellüberleben und wirkt der Apoptose entgegen (Parcellier et al., 2008). Ein alleiniger Akt-KD führte zur Induktion des Zelltodes. Einige Veränderungen in der Zellmorphologie konnten bereits 48 Stunden nach der Transfektion mit den Akt-siRNAs festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Nach 72 Stunden verstärkten sich die morphologischen Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den mit Akt-siRNA-behandelten Zellen, und die Anzahl der absterbenden Zellen stieg deutlich an (**Abb. 4.25**). Eine gleichzeitige Unterdrückung der Proteinsynthese aller drei Akt-Isoformen führte zu einer stärkeren Abnahme der Zelldichte (**Abb. 4.25 C**), als das Ausschalten von nur einer der drei Akt-Isoformen (**Abb. 4.25 D-F**).

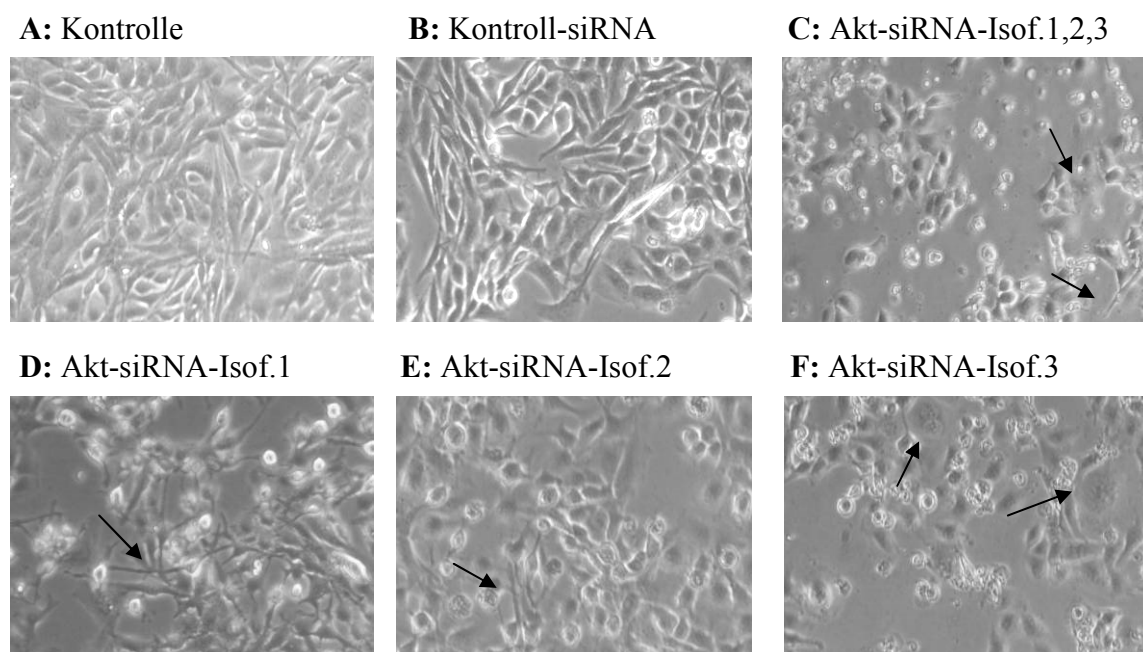


Abb. 4.25 Morphologische Veränderungen von Zellen unter einem Akt-KD. Die Liposarkom SW872-Zellen wurden mit einer unspezifischen siRNA (**B**), mit siRNAs gegen Akt-Isoform-1 (**D**), Akt-Isoform-2 (**E**), Akt-Isoform-3 (**F**) und mit siRNAs gegen alle drei Isoformen zusammen (**C**) adenoviral transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Typische apoptotische Veränderungen der Morphologie wie etwa das Abrunden und Ablösen der Zellen und *membrane blebbing* (Pfeile). Gezeigt wird ein repräsentatives Bild von drei unabhängigen Experimenten.

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die beobachteten Veränderungen in der Zellmorphologie einer Apoptoseinduktion zugeschrieben werden können. Darüber hinaus wurde überprüft, ob Perifosin die Akt-KD-vermittelte Apoptose nach einer Hitzeschockbehandlung verstärkt. Dazu wurden die Liposarkom SW872-Zellen der oben beschriebenen Behandlung (**Abb. 4.19**) unterzogen und die Apoptose-Marker Caspase-3 und PARP mittels Western Blot analysiert.

Die Analyse auf molekularer Ebene zeigte, dass ein Akt-KD mit oder ohne eine Perifosinbehandlung zur Spaltung der Caspase-3 führte (**Abb. 4.26, Spur 3 und 4**). Ein zweieinhalbstündiger Hitzeschock hatte auf die Spaltungsrate der Caspase-3 keinen weiteren Einfluss. Ebenfalls wurde die Fragmentierung von PARP durch den Akt-KD induziert. Den Ergebnissen aus dem Western Blot zufolge wies hier PARP eine erhöhte Expression nach der zweieinhalb-stündigen Hitzeexposition auf (**Spur 5 und 6**), die in Zellen mit einem Akt-KD hingegen nicht festgestellt werden konnte (**Spur 7 und 8**).

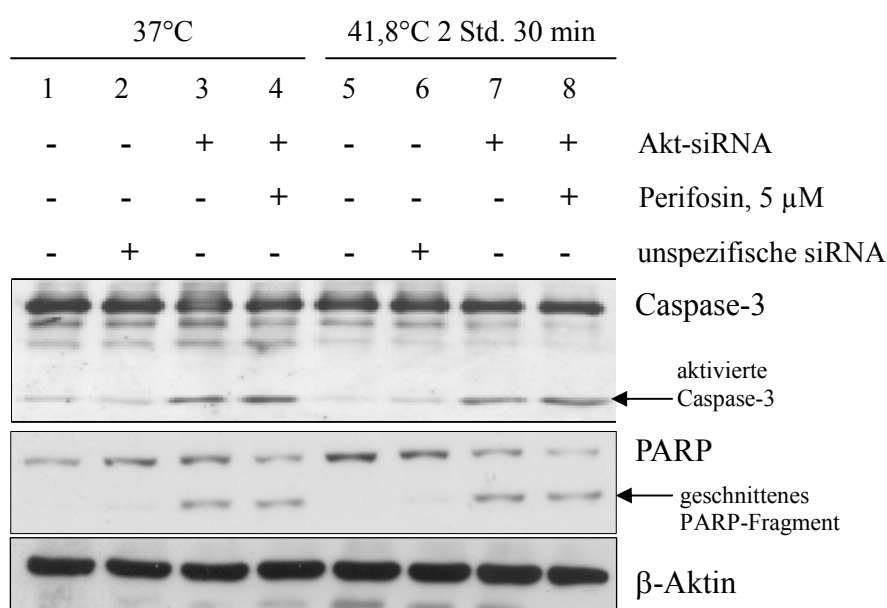


Abb. 4.26 Induktion der Caspase-3-Aktivierung und PARP-Spaltung durch den Akt-KD mit und ohne Hitzeschock. Die SW872-Zellen wurden mit siRNAs gegen Akt-1, -2 und -3 transfiziert. Nach einer 90-stündigen Inkubation mit siRNAs erfolgte die Zugabe von 5 µM Perifosin. Zehn Std. danach wurden die Zellen einem zweieinhalb-stündigen Hitzeschock ausgesetzt und anschließend für die Proteinextraktion geerntet. Die Apoptose-Marker Caspase-3 und PARP wurden mittels Western Blot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf unabhängigen Versuchen.

Die Ergebnisse deuten auf eine Hochregulation der PARP-Expression durch die Hitzeexposition hin, während unter Akt-KD die Fragmentierung von PARP stattgefunden hat. In beiden Fällen, mit oder ohne Hitzeschock, führte der Akt-KD zur Induktion der Apoptose. In den Akt-KD-Zellen, in denen das Zielprotein Akt fehlte, konnte die Apoptose durch Perifosin nicht weiter verstärkt werden.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Ein klinisch relevanter subletaler Hitzeschock von 41,8°C induzierte in allen untersuchten Sarkomzelllinien die Aktivierung des Akt-mTOR-Signaltransduktionsweges.
2. Eine Akt-Inhibition mit Perifosin verhinderte die Phosphorylierung in der Akt-mTOR-p70S6K-Kaskade und reduzierte die durch einen Hitzeschock induzierte HSP70 Expression. Die Akt-Inhibition führte zur Apoptose und sensibilisierte die Zellen gegenüber einem Hitzeschock.
3. Die durch Doxorubicin-vermittelte Phosphorylierung von Akt und die Doxorubicin-induzierte Hochregulation von PARP wurden durch Perifosin verhindert. Perifosin verstärkt die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin. Dabei konnte eine deutliche Zunahme der Apoptoseinduktion in Sarkomzellen nach einer Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen nachgewiesen werden. Die höchste Sterberate der Sarkomzellen wurde bei einer Behandlung mit Doxorubicin und Perifosin unter Hitzeschock erreicht.

6. Diskussion

Hyperthermie als Zusatztherapie zur Chemo- und/oder Radiotherapie ist ein effektives Verfahren in der Krebstherapie (Issels, 2010). Allerdings ist das genaue Verständnis über die molekularbiologischen Vorgänge in hyperthermierten Zellen noch nicht ausreichend geklärt und stellt daher einen Kernpunkt in der Erforschung der biologischen Wirkung der Hyperthermie dar. Interessanterweise übt ein Hitzeschock einerseits schädigende Auswirkungen auf die Zelle aus, andererseits werden durch den Hitzeschock Schutzmechanismen und möglicherweise auch Überlebenssignalwege, wie zum Beispiel der Akt-mTOR-Signalweg aktiviert.

Der Akt-mTOR-Signalweg, der in Tumorzellen häufig konstitutiv hyperaktiv ist, spielt sowohl in der Karzinogenese, als auch in der Entwicklung von Radio- und Chemotherapie-Resistenzen eine bedeutende Rolle. Dieser Signalweg wurde in Sarkomen unter Hyperthermie und Chemotherapie bisher kaum charakterisiert. Wegen seiner proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Wirkung repräsentiert der Akt-mTOR-Signalweg ein vielversprechendes Ziel in der Entwicklung von molekularen zielgerichteten Therapeutika in der Krebstherapie. Daher war das Ziel dieser Arbeit, den Akt-mTOR-Signalweg in Sarkomzellen *in vitro* unter Hitzeschock-Bedingungen in Kombination mit dem zielgerichteten Therapeutikum Perifosin und/oder dem Chemotherapeutikum Doxorubicin zu untersuchen.

6.1 Ein Hitzeschock im Bereich von klinisch relevanten Temperaturen aktiviert den Akt-mTOR-Signalweg

Eine Aktivierung von Akt als Antwort auf unterschiedliche Stressfaktoren wurde bereits in einigen Studien beschrieben. So wurde in experimentellen Arbeiten an mehreren Modelzelllinien (z.B. COS-7, CHO, NIH3T3) nachgewiesen, dass Stressstimuli, wie z.B. oxidativer Stress (H_2O_2) oder ein Hitzeschock von 40-43°C, zur Hyperaktivierung von Akt führen. Bemerkenswerter Weise kann die durch Stressfaktoren ausgelöste Aktivierung von Akt auf Pi3K-abhängigen oder Pi3K-unabhängigen Wegen, vermittelt werden. Diese Prozesse sind Zelltyp-abhängig und die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bislang nicht eindeutig geklärt (Konishi

et al., 1999; Shaw et al., 1998; Matsuzaki et al., 2004; Pham et al., 2000; Moon et al., 2003). Die durch einen Hitzeschock ausgelöste Aktivierung von Akt bei Temperaturen von 40-43°C kann sich in einer verstärkten Signalweiterleitung im Akt-mTOR-Signalweg widerspiegeln, wie es beispielsweise *in vitro* an humanen Muskelzellen gezeigt wurde (Kakigi et al., 2011). Ebenfalls haben *in vivo*-Studien an Ratten gezeigt, dass eine 30-minütige Hyperthermie bei Temperaturen von 41-42°C eine signifikante Hyperphosphorylierung von einigen Kinasen, darunter auch von Akt, im hyperthermierten Gewebe hervorruft (Maroni et al., 2000).

Durch die kinetische Akt-Aktivität werden anti-apoptotische Signalwege in der Zelle aktiviert und pro-apoptotische inhibiert (Chalhoub und Baker, 2009). Aus diesen Gründen hat die Aktivierung von Akt während oxidativem Stress oder einem Hitzeschock eine große Bedeutung, da es möglicherweise für eine gewisse Zeitspanne Schutz gegen den Zelltod gewährt (Shaw et al., 1998). Die darauf folgende Aktivierung von mTOR deutet auf eine Induktion wichtiger Überlebensprozesse in der Zelle hin, wie Proteinsynthese, Zellwachstum, Proliferation, sowie der Anstieg der metabolischen Aktivität (Memmott und Dennis, 2009). Jedoch können die Prozesse und die Funktionalität der hitzeinduzierten Hyperaktivierung von Akt, wie auch der nachfolgenden Proteine mTOR und p70/p85 S6K in diversen Zelltypen, unterschiedlich ablaufen und zu unterschiedlichen Implikationen führen.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen eines Hitzeschocks im Bereich der klinisch relevanten Temperaturen von 41,8°C und 43°C (Issels, 2008) auf den Akt-mTOR-Signalweg in verschiedenen Sarkomzelltypen und in einer Pankreaskarzinomzelllinie analysiert. In allen untersuchten Zelllinien bewirkte ein Hitzeschock bei 41,8°C eine starke Induktion der Phosphorylierungen von Kinasen des Akt-mTOR-Signalweges an deren regulatorischen Phosphorylierungsstellen, was auf eine Aktivierung dieser Signalkaskade hindeutet (Chalhoub und Baker, 2009). Die Phosphorylierung von Akt wurde sowohl an seiner regulatorischen Domäne (Ser473), als auch an seiner katalytischen Domäne (Thr308) induziert. In der Arbeit von Matsuzaki wurde gezeigt, dass die Akt-Phosphorylierung am Thr450 während eines Hitzeschocks ebenfalls induziert wird. Die Phosphorylierung am Thr450, sowie am Ser473 sind zwar nicht essentiell für die enzymatische Aktivität von Akt, aber für seine volle Aktivierung notwendig (Matsuzaki et al., 2004). Bekannterweise ist die Akt-Aktivierung von PIP₃, das

durch die Lipidkinase Pi3K generiert wird, abhängig (Chalhoub und Baker, 2009). Da die durch Stressfaktoren ausgelöste Aktivierung von Akt auf Pi3K-abhängigen oder Pi3K-unabhängigen Wegen vermittelt werden kann (Matsuzaki et al., 2004; Konishi et al., 1999), deutet es auf ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedener regulatorischer Prozesse hin, die durch Stresseinwirkungen induziert werden.

Die Regulation der mTOR-Proteinkomplexe (mTORC1 und mTORC2) und folglich der p70/p85 S6 Kinasen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es sind mehrere Phosphorylierungsstellen bekannt, die für die Regulation, die Komplexbildung und für die Kinase-Aktivität von mTOR eine Rolle spielen. Eine wichtige Bedeutung für die mTOR-Aktivität haben jedoch eine Akt-abhängige Regulation der Phosphorylierung am Ser2448 (Sekulić et al., 2000) und die Autophosphorylierung am Ser2481 (Soliman et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden die Phosphorylierungen aller dieser regulatorischen Phosphorylierungsstellen unter Hitzeschockbedingungen (41,8°C) nachgewiesen. Interessanterweise wurde berichtet, dass einige Stressstimuli, wie Hypoxie oder eine geringe Energieversorgung, im Gegenteil zu einer Inhibierung des Akt-mTOR-Signalweges führen (Wullschlegel, 2006).

Die Induktion der Phosphorylierungen von Akt-Ser473, Akt-Thr308, mTOR-Ser2481, sowie p70/p85 S6K-Thr389/Thr412, konnte bereits nach einem einstündigen Hitzeschock detektiert werden und war über die gesamte Zeitspanne von sechs Stunden der Hitzeexposition bei 41,8°C beständig. Dies zeigt auf eine relativ rasche und langanhaltende Aktivität dieses Signalweges unter Hitzeschock-Bedingungen. An den Zelllinien SW3T3 und NIH3T3 wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Akt durch einen Hitzeschock bei 45°C viel schneller und stärker induziert wird, als wie bei niedrigeren Temperaturen von 40-42°C. Als Antwort auf Temperaturen von 40-42°C wurde eine vervielfältigte Akt-Aktivierung bestimmt; die stärkste kinetische Aktivität von Akt wurde jedoch bei 45°C nach einer ca. 10-20-minütigen Hitzeexposition ermittelt. Danach nahm die Aktivität kontinuierlich ab, blieb jedoch innerhalb der analysierten Zeitspanne (eine Stunde) höher als der Kontrolle bei 37°C (Shaw et al., 1998). Dies zeigt, dass unter Stressbedingungen – wie ein Hitzeschock – eine rasche Induktion der Hyperaktivierung des Akt-mTOR-Signalweges stattfindet, um möglicherweise die Schutzmechanismen gegen die Schädigungen und/oder das Absterben der Zelle zu aktivieren. Die Dauer der Aktivität zum „Selbstschutz“ wird

durch die Stärke des induzierenden Stressfaktors bestimmt, was eine entscheidende Rolle für das Überleben abhängig von dem Ausmaß der Stresseinwirkung spielt. Die zugleich erfasste Induktion der HSP70-Expression belegt die entsprechende Reaktion der Zelle auf einen Hitzeschock. Im Verlauf der Inkubation nimmt die induzierte Menge des HSP70 nach einer Stunde der Hitzeexposition kontinuierlich zu und ist über die gesamte Zeitspanne des Experiments von sechs Stunden zu beobachten. Dies deutet auf eine zeitgleiche Proteinsynthese während des Hitzeschocks hin, was die physiologische Relevanz der vorher beschriebenen Aktivierung von mTOR untermauert. Publierte Daten zeigen, dass ein enges Zusammenspiel in den regulatorischen Mechanismen zwischen der Akt-Aktivität und der Expression von Hitzeschockproteinen besteht (Rane et al., 2003; Powers et al., 2008; Sato et al., 2000). Daher liegt die zusätzliche Behauptung nahe, dass durch den Hitzeschock aktiviertes Akt und mTOR in die Induktion der HSPs mit involviert sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen rechtfertigt sich die Annahme, dass die Hitzeschock-induzierte Aktivierung des Akt-mTOR-Signalweges die Expression von HSPs mit steuern kann, um über einen gewissen Zeitraum das Überleben von hyperthermierten Zellen zu vermitteln. Ausgehend von diesen Vermutungen wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die Zellen, die einen hohen Phosphostatus von Akt haben, eine geringere Hitzeempfindlichkeit aufweisen. Oft wird eine Hyperaktivierung von Akt aufgrund der defizienten Funktion der PTEN-Lipidphosphatase festgestellt, was bei vielen Tumorarten auftritt (Zhang und Yu, 2010). Für die experimentelle Analyse wurde in dieser Arbeit eine murine embryonale Stammzelllinie verwendet, bei der ein PTEN-KD durch Doxycyclin reversibel induziert werden kann, um die Hyperphosphorylierung von Akt hervorzurufen. Die WST-1-Analyse der PTEN-defizienten Zellen, die bei 37°C oder bei 41,8°C inkubiert wurden, ergab eine deutliche Steigerung der Vitalität und der Proliferationsrate. Durch die Anwendung des Akt-Inhibitors Perifosin konnten diese Effekte deutlich reduziert werden. Allerdings ist die gemessene metabolische Aktivität der mit Perifosin behandelten Zellen unter PTEN-KD höher als der Status der Kontrollzellen geblieben, was mit einer unvollständigen Inhibition der durch PTEN-KD aktivierten Phosphorylierung von Akt zu erklärt ist. Eine Hitzeexposition bei 43°C, die mit einer starken Phosphorylierung von Akt einhergeht, verursachte ein starkes Zellsterben, und

zwar sowohl bei den Zellen mit einer Hyperaktivität von Akt, als auch bei den Zellen mit einer niedrigen basalen Aktivität dieser Kinase. Jedoch zeigten die Zellen mit hyperaktivem Akt im Vergleich zu Kontrollzellen eine etwas bessere Überlebensfähigkeit, was wiederum durch Perifosin verringert werden konnte.

Die Ergebnisse des Klonogenen Assays zeigten, dass die Zellen mit einer hochregulierten Akt-Aktivität zu viel größeren Kolonien aus einer einzigen Zelle heranwachsen konnten, obwohl die Zahl der Kolonien – im Vergleich zu den Zellen mit einer basalen Akt-Aktivität – nur geringfügig erhöht war. Das klonogene Überleben der Zellen mit hyperaktiviertem Akt, das durch einen PTEN-KD hervorgerufen wurde, hat sich nach einem Hitzeschock nur wenig erhöht. Durch den Akt-Inhibitor Perifosin wurden die Zahl der Kolonien und die Gesamtzellzahl reduziert. Die Ergebnisse zeigen, dass Akt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Proliferation, der Vitalität, sowie der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen spielt. Ein hitzeverstärkender Effekt durch Perifosin im klonogenen Überleben dieser Zellen zeigt sich nur bei einer basalen Akt-Aktivität, nicht jedoch bei den Zellen, bei denen zuvor die Akt-Hyperphosphorylierung durch einen PTEN-KD hervorgerufen wurde. Anhand der Analyse des Phosphostatus von Akt wird die Behauptung aufgestellt, dass die eingesetzte Menge des Akt-Inhibitors Perifosin die Hyperphosphorylierung von Akt, die durch PTEN-KD hervorgerufen wurde, nur unvollständig verhindert wurde. Deswegen waren die Effekte der Hitzesensibilisierung durch die Perifosinbehandlung nicht eindeutig sichtbar. Außerdem deutet dieses Ergebnis auf eine sehr relevante Rolle von PTEN in der Regulation der Aktivität des Akt-mTOR-Signalweges im Zellüberleben hin.

6.2 Perifosin sensitiviert die Sarkomzellen gegenüber Hitzeschock und supprimiert das klonogene Überleben

Um die Bedeutung der Hitzeschock-induzierten Phosphorylierung von Akt in Hinsicht auf das Überleben der Sarkomzellen aufzuklären, wurde der Akt-Inhibitor Perifosin eingesetzt. Somit konnte sowohl die konstitutive Phosphorylierung von Akt, als auch die durch einen Hitzeschock induzierte Phosphorylierung dieser Proteinkinase mit einer Konzentration von 5 μM , deutlich gesenkt werden. Bei dieser Konzentration von

Perifosin zeigten alle untersuchten Sarkomzelllinien ebenso eine Reduktion der Vitalität 24 Stunden nach der Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Da bei WST-1-Assay überwiegend die Vitalitäts- und Proliferationsrate der Zellen bestimmt wird, könnte schlussgefolgert werden, dass Akt eine einflussreiche Rolle in der Regulation der metabolischen Aktivität und im Zellüberleben einnimmt. Durch die Inhibierung von Akt durch Perifosin wurde die Funktionalität dieser Prozesse, die für das Zellüberleben notwendig sind, unterdrückt. Zudem konnte in dieser Arbeit eine sensitivierende Wirkung von Perifosin gegenüber einem Hitzeschock bestimmt werden. Die Vitalität der hitzeexponierten Sarkomzellen wurde allerdings unterschiedlich durch die Perifosinbehandlung moduliert. Die zweieinhalb-stündige Hitzeexposition bei 41,8 und 43°C verminderte die Vitalität von SW872-Zellen deutlich, die einer Perifosinbehandlung (1-15 μM) ausgesetzt waren. Dies spricht für einen hitzesensitivierenden Effekt von Perifosin. Ein zweieinhalb-stündiger Hitzeschock der Fibrosarkom HT1080- und den Osteosarkom MG63-Zellen, die ebenfalls mit einer 1-15 μM Perifosinkonzentration behandelt wurden, hatte keine signifikant verstärkende Auswirkung auf die Zellvitalität. Durch die Western Blot Analyse hat sich herausgestellt, dass die SW872-Zellen über kein PTEN-Protein verfügen, was zur Akkumulation von PIP_3 führt, da dieses aufgrund der fehlenden Lipidphosphatase PTEN nicht mehr zu PIP_2 dephosphoryliert wird. Das hat zur Folge, dass Akt in SW872-Zellen kontinuierlich aktiviert werden kann. Wie auch die Analyse von Phospho-Akt zeigt, liegt der Phosphostatus von Phospho-Akt-Ser473 und -Thr308 in SW872-Zellen relativ hoch, gegenüber den MG63- und HT1080-Zellen, die über eine reguläre PTEN-Expression verfügen. Aufgrund dieser Erkenntnis kann erklärt werden, warum die SW872-Zellen nach einem Hitzeschock im Vergleich zu HT1080- und MG63-Zellen empfänglicher auf eine Behandlung mit dem Akt-Inhibitor Perifosin reagierten. Diese Resultate bekräftigen die Aussage, dass die Intensität der proapoptotischen Wirkung von Perifosin mit der Akt-Aktivität in den Tumorzellen korreliert (Hennessy, 2007).

Im selben Ausmaß verminderte Perifosin das klonogene Überleben der analysierten Zelllinien. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien war bei Osteosarkom MG63-Zellen um 20% und bei Liposarkom SW872-Zellen um 50% reduziert. Bemerkenswert ist, dass nicht nur die Zahl der Kolonien, sondern auch die Dichte der Zellen bei einer

nach 14 Tagen gebildeten Kolonie deutlich vermindert war. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung des Akt-Inhibitors entsprechend einen zytotoxischen und einen zytostatischen Effekt aufweist. Anhand des klonogenen Assays wurde gezeigt, dass diese zytotoxischen und zytostatischen Effekte von Perifosin bei beiden analysierten Sarkomzelltypen SW872 und MG63 verstärkt wurden, wenn die Zellen nach der Perifosin-vermittelten Akt-Inhibierung einem Hitzeschock bei 41,8°C oder 43°C für zweieinhalb Stunden ausgesetzt waren. So kann postuliert werden, dass der aktivierte Akt-Signalweg eine schützende Funktion im Überleben der Tumorzellen nach einem Hitzeschock einnimmt, zumal eine ähnliche hitzesensitivierende Wirkungen ebenfalls im Mamakarzinom *in vitro* durch den Pi3K-Inhibitor Wortmannin erzielt werden konnte (Ma et al., 2004). Diese Daten untermauern die vielversprechende Rolle von Perifosin als einen potenten Inhibitor des Tumorwachstums (Richardson et al., 2007; Vogelzang et al., 2009; Pal et al., 2010).

Somit scheint die Anwendung von Inhibitoren der Akt-Signalkaskade, wie beispielsweise Perifosin als zielgerichtetes Therapeutikum, eine neue Möglichkeit darzustellen, wie die Krebszellen während einer Hyperthermie zu sensitivieren und die Hitzeeffekte zu verstärken. Allerdings konnte in diesem experimentellen Ansatz nicht eindeutig festgestellt werden, ob die anti-tumoralen Effekte der Kombination von Perifosin mit einem Hitzeschock auf einen unabhängigen molekularen Mechanismus zurückzuführen sind. Dies bedarf weiterer präklinischer und klinischer Untersuchungen, um eine klinische Anwendung derartiger Inhibitoren sicherzustellen.

6.3 Sensitivierung der Sarkomzellen gegenüber Doxorubicin durch die Behandlung mit Perifosin

Derzeit basiert die Behandlung von Sarkom-Patienten sowohl in der Standard-, als auch in der RHT-kombinierten Therapie auf dem Chemotherapeutikum Doxorubicin. Der Akt-mTOR-Signalweg kann sowohl durch einen Hitzeschock, als auch unter dem Einfluss von Doxorubicin induziert werden, was zur Entstehung einer Resistenz gegenüber Doxorubicin im Verlauf der Therapie beitragen kann (Knuefermann et al., 2003; West, 2002). Akt ist ein Konvergenzpunkt vieler Wachstumsfaktoren und ist in der Regulation vieler zellulärer Prozesse involviert, die zur Initiierung und Progression

von Krebs beitragen. Außerdem ermöglicht die Aktivierung des Akt-mTOR-Signalweges die Entwicklung von Resistenzen während der Krebstherapie und ist ein schlechter Prognosemarker bei einigen Krebsarten. Aus diesen Gründen ist das Akt-Protein ein sehr interessantes Zielprotein in der Krebstherapie. (Lo Piccolo, 2008). Aufgrund seiner anti-proliferativen Eigenschaften stellt der Akt-Inhibitor Perifosin ein vielversprechendes zielgerichtetes Therapeutikum in der Krebstherapie dar (Blitterswijk, 2008). Als Monotherapeutikum zeigte Perifosin nach der Anwendung in klinischen Phase II Studien keine klinische Relevanz in der Behandlung von soliden Tumoren (Gills und Dennis, 2009). Als alternative Strategie wird Perifosin als Zusatztherapeutikum bei vielen Anwendungen wie Chemotherapie, Radiotherapie und anderen zielgerichteten Therapeutika getestet, um durch die Akt-Inhibition die Zytotoxizität zu erhöhen und Resistenzentwicklungen zu vermeiden (Lo Piccolo, 2008). Die Effektivität von Perifosin konnte in Kombinationsbehandlungen mit anderen zielgerichteten Therapeutika erwiesen werden, wie z.B. mit dem Proteosom-Inhibitor Bortezomib, dem mTOR-Inhibitor Rapamycin, dem Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) oder mit Lenalidomid/Dexamethason bei der Behandlung von multiplen Myelomen (Li et al., 2010). Zudem zeigte Perifosin sensitivierende Eigenschaften bei einer kombinierten Anwendung bei soliden Tumoren mit Taxanen, Gemcitabin (Phase I Studien) und mit Radiotherapie (Phase II Studien) (LoPiccolo, 2008; Vink et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden die Effekte einer Kombinationsbehandlung von dem Akt-Inhibitor Perifosin mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin und einem Hitzeschock an verschiedenen Sarkomzelllinien experimentell untersucht. Es wurde gezeigt, dass eine Kombinationsbehandlung der Sarkomzellen mit Perifosin und Doxorubicin eine verstärkte Reduktion der Vitalität im Vergleich zu den Zellen hervorrief, die nur einem der beiden Wirkstoffe ausgesetzt waren. Die Hitze zeigte einen sensitivierenden Effekt auf die Vitalität der Sarkomzellen nach den Behandlungen mit nur einem der beiden Substanzen von durchschnittlich 5 bis 10%. Ein Hitzeeffekt bei der Kombinationsbehandlung liegt unter 5% und ist nicht signifikant für die Beeinträchtigung der Vitalität.

Morphologische Veränderungen der behandelten Zellen bestätigen, dass die Sterberate bei mit Doxorubicin und Perifosin behandelten Zellen deutlich erhöht ist.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit anhand der mikroskopischen Aufnahmen festgestellt werden, dass die Osteosarkom MG63-Zellen weder eine Zu- noch eine Abnahme der Zelldichte bis zu 72 Stunden nach der Zugabe von Doxorubicin zeigten. Im Gegensatz dazu, wiesen die Liposarkom SW872-Zellen bereits 24 Stunden nach der Zugabe von Doxorubicin eine hohe Sterberate auf. Dies deutet auf eine relative Resistenz der MG63-Zellen gegenüber Doxorubicin hin. Dies scheint aber den Ergebnissen des WST-1-Assays zu widersprechen, die eine starke Abnahme in der Vitalität dieser Zellen nach einer Doxorubicinbehandlung zeigten. Allerdings kann aufgrund dieser Erkenntnisse vermutet werden, dass die MG63-Zellen durch die Doxorubicinbehandlung in den Zellzyklusarrest versetzt werden (Lüpertz et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass bei einer Doxorubicinbehandlung die Induktion der PARP-Expression stattgefunden hat. PARP ist ein nukleäres Enzym, das die ADP-Ribosylierung von Chromatinproteinen katalysiert und in den Reparaturmechanismen von DNA-Schäden eine wichtige Funktion hat. Der Literatur nach, kann eine Induktion von PARP als Antwort auf gentoxischen Stress unter Doxorubicin auftreten, um entstehenden DNA-Schäden entgegenzuwirken. Eine Inhibierung von PARP führt zu einer signifikanten Verstärkung der zytostatischen Wirkung von Doxorubicin, indem die Apoptoserate deutlich erhöht wird (Munoz-Gamez et al., 2005). Die bedeutsame Rolle des Enzyms bestätigt sich in der Entwicklung und Durchführung klinischer Studien zur Anwendung von PARP-Inhibitoren in der Krebstherapie (Cipak und Jantova, 2010).

In dieser experimentellen Arbeit wurde gezeigt, dass in SW872-Zellen nach einer 90-minutigen Hitzeexposition bei 41,8°C bzw. nach einer Doxorubicinbehandlung die PARP-Expression nur geringfügig induziert wurde. In MG63-Zellen wurde dagegen eine stärkere Hitzeschock-bedingte Induktion und eine sehr starke Zunahme des PARP Proteins nach der Doxorubicinbehandlung festgestellt. So kann die besonders bei Osteosarkom MG63-Zellen ausgeprägte Induktion der PARP-Expression in die relative Resistenz dieser Sarkomzellen involviert sein. Im Gegensatz zu SW872-Zellen, zeigten MG63-Zellen keine für eine zytotoxische Behandlung typische morphologische Veränderungen nach einer Doxorubicinbehandlung. Die Induktion von PARP in MG63-Zellen war weitere 48 Stunden nach der Doxorubicinbehandlung sehr stark ausgeprägt, während bei SW872-Zellen bereits 24 Stunden nach der

Behandlung eine fast vollständige Fragmentierung von PARP stattgefunden hat, was für eine Apoptoseinduktion spricht. Dementsprechend wiesen die SW872-Zellen einen deutlichen Vitalitätsverlust auf und zwar sowohl in deren metabolischen Aktivität, als in ihrer morphologischen Veränderungen. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine fortgeschrittene Apoptose in SW872-Zellen in Gegensatz zu MG63-Zellen hin. Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren weiterhin, dass die Fragmentierung des PARP-Proteins durch die Behandlung mit Perifosin initiiert wird. Somit kann dessen Funktion in der DNA-Reparatur verhindert und dadurch die Sterberate der Sarkomzellen erhöht werden. In Liposarkom SW872-Zellen wird die Fragmentierung unter der gleichzeitigen Behandlung mit Doxorubicin und Perifosin deutlich verstärkt. Hierbei ist zu erwähnen, dass auch die durch Doxorubicin induzierte PARP-Expression in SW872- und in MG63-Zellen durch Perifosin deutlich unterdrückt wurde. Folglich deuten die Daten darauf hin, dass Akt, das von Perifosin inhibiert wird, eine wichtige Rolle in der Doxorubicin-vermittelten PARP-Induktion einnehmen kann. Bemerkenswert ist, dass eine Perifosinbehandlung bei MG63-Zellen nicht nur die induzierte Expression von PARP verhindert, sondern auch deutlich seine Fragmentierung in den mit Doxorubicin behandelten Zellen steigert. Dies bedeutet, dass die Apoptose bei der Kombinationsbehandlung mit Perifosin verstärkt induziert wird und eine relative Resistenz gegenüber Doxorubicin in MG63-Zellen aufgehoben werden kann. Somit konnte in diesem experimentellen Ansatz die Sterberate dieser Sarkomzellen bedeutend erhöht werden.

Durch Perifosin konnte die Sensitivität gegenüber Doxorubicin in Fibrosarkom HT1080-Zellen, die bekannterweise eine niedrige Sensitivität gegenüber Doxorubicin und Etoposid aufweisen (Zwelling et al., 1990), ebenfalls gesteigert werden. Der Mechanismus der Doxorubicin-induzierten Phosphorylierung von Akt kann mit der Deaktivierung der GTPase RhoA und FAK (*focal adhesion kinase*) in HT1080-Zellen erklärt werden (Fourre et al., 2008; Ueda et al., 2004; Ming et al., 2002). Die Dysregulation des negativen Regulators RhoA im Pi3K-Akt-Signalweg beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von PTEN und führt zu einer sehr starken Induktion der Phosphorylierung von Akt (Zhong Li et al., 2005; Heijden et al., 2008; Nakashima et al., 2010). So kann die Hyperaktivierung des Pi3K-Akt-mTOR-Signalweges zu einer Resistenzentwicklung beitragen (Knuefermann et al., 2003; Liang et al., 2003). Belege dafür

liefern einige Studien, in denen durch die Akt-Inhibition mit Perifosin resistente Krebszellen *in vitro* und Tumoren eines Xenograft-Modells *in vivo* gegenüber dem jeweiligen Zytostatikum wieder sensitiviert werden konnten (Hideshima, 2007; Chiarini, 2008).

Zudem führte die Kombination von Doxorubicin mit Perifosin nach einer 24-stündigen Inkubation im Vergleich zur Einzelgabe von Doxorubicin, zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität bei HT1080-Zellen. Dies ist ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle des Akt-mTOR-Signaltransduktionswegs bei HT1080-Zellen während einer Doxorubicinbehandlung. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit auch zeigen, wurde durch Doxorubicin eine vervielfachte Akt-Phosphorylierung induziert. Im gleichen Experiment wurde ebenso eine Induktion der PARP-Expression unter Doxorubicin festgestellt, was möglicherweise ebenfalls zur Verminderung der Sensitivität auf das Zytostatikum beiträgt. Wenn die Phosphorylierung und damit die Aktivität von Akt verhindert werden, z.B. durch die Gabe von Perifosin, können die pro-apoptotischen Signalwege dominieren. Die Detektion der verstärkten Aktivierung der Caspase-3 und der Fragmentierung von PARP bei einer Kombinationsbehandlung – im Vergleich zur Einzelgabe von Perifosin oder Doxorubicin – bestätigt die ermittelten Aussagen des Vitalitätstests. Demnach steigert die Kombination der beiden Substanzen die Apoptose in den Sarkomzellen, und dies vermutlich, durch das Verhindern der Doxorubicin-induzierten PARP-Expression und der Akt-Aktivierung durch den Akt-Inhibitor Perifosin.

Schlussfolgernd kann zusammengefasst werden, dass die Akt-Inhibition mit Perifosin Sarkomzellen gegenüber einem Hitzeschock sensitiviert, die Vitalität und Proliferation reduziert, pro-apoptotische Effekte zeigt und die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin deutlich verstärkt.

6.4 Auswirkungen eines Akt-Knock-Downs auf pro- und anti-apoptotische Signalwege unter Hitzeschockbedingungen und Perifosin.

Aufgrund seiner anti-proliferativen Eigenschaften stellt Perifosin ein vielversprechendes zielgerichtetes Therapeutikum in der Krebstherapie dar (Blitterswijk, 2008). Perifosin wird einerseits als ein spezifischer Akt-Inhibitor beschrieben,

andererseits deuten einige publizierte Daten auf eine vielfältige Rolle des Inhibitors in der Induktion der Apoptose hin, wie beispielsweise eine Aktivierung der p38-MAP Kinase, die in der Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle spielt (Li, 2006). Ebenso soll die Behandlung mit Perifosin *in vitro* eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der Erk1/2 MAP Kinasen induzieren, die wiederum überwiegend anti-apoptotische Effekte bewirken (Steelman, 2004). Außerdem wurde beschrieben, dass Perifosin, wie auch andere Alkylphospholipide mit der zellulären Plasmamembran interagiert, was zur Störung der Membranfluidität und –permeabilität führt und somit zum Zellsterben beitragen kann (Jendrossek et al., 2003; Ruiter et al., 2001).

Um die unspezifischen Effekte von Perifosin auf die Vitalität und die metabolischen Veränderungen bei den untersuchten Sarkomzellen zu verifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die RNAi-Technik angewandt. Diese molekulare Methode ermöglicht eine genaue Untersuchung der zellulären Abläufe, die von der Funktionalität des unterdrückten Proteins abhängen. Mittels selektiven siRNAs gegen die drei Akt-Isoformen (Akt1, Akt2 und Akt3) konnte in diesem experimentellen Ansatz eine effiziente Unterdrückung des gesamten endogenen Akt-Proteins in der ausgewählten Liposarkom SW872-Zelllinie erreicht werden. Unter den Akt-KD-/Perifosin-/Hitzeschock-Bedingungen wurden hier die regulatorischen Phosphorylierungen der nachfolgenden Proteine von Akt, wie GSK3 α/β , mTOR und p70/85 S6K analysiert. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen des Akt-KDs auf den Phosphostatus der p38 und ERK1/2 MAP Kinasen untersucht, da diese Kinasen, wie oben beschrieben, einer unspezifischen Wirkung von Perifosin unterliegen können (Li, 2006; Steelman, 2004). Einer der wichtigen Punkte dieses Experimentes war die Analyse der Expression bzw. der Hitzeschock bedingten Induktion der Expression von HSP70, HSP90 und HSP27. Außerdem wurde anhand der Aktivierung von Caspase-3 und der nachfolgenden PARP-Fragmentierung die Apoptoseinduktion bestimmt.

Wie in den Hitzeschock-Experimenten gezeigt wurde, wird die Hitzeschock-induzierte Akt-Phosphorylierung mit der Induktion der Phosphorylierung des nachfolgenden Zielproteins mTOR begleitet. Die Phosphorylierung von mTOR wurde bei 41,8°C sowohl am Ser2481 als auch am Ser2448 hochreguliert. Die Hitzeschock-induzierte Akt-abhängige Phosphorylierung am Ser2448 wird deutlich minimiert, wenn Akt unterdrückt ist. Interessanterweise zeigt auch die Phosphorylierung am Ser2481, die

als Autophosphorylierung bezeichnet wird (Soliman et al., 2010) unter den Akt-KD- und Hitzeschock-Bedingungen Veränderungen: die durch den Hitzeschock induzierte Erhöhung des Phosphostatus ist deutlich vermindert. Dies deutet darauf hin, dass Akt in der Regulation der Autophosphorylierungsreaktion von mTOR am Ser2481 mit beteiligt ist.

So konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass ein Hitzeschock ebenfalls, neben den Stimulationen, wie etwa Wachstumsfaktoren oder der zelluläre Energiestatus (Sekulić et al., 2000), aktivierende Auswirkungen auf mTOR hat. Dies wird durch die Hitzeschock-induzierte verstärkte Phosphorylierung des nachfolgenden Zielproteins p70/p85 S6K bestätigt. Sowohl die konstitutive, als auch die durch Hitzeschock induzierte Phosphorylierung von p70/p85 S6K wurde unter Akt-KD-Bedingungen reduziert. Die Induktion der Phosphorylierung wurde durch die zusätzliche Verabreichung von Perifosin weiterhin gemindert. Dieser Effekt lässt sich dadurch erklären, dass eine starke, aber nicht vollständige, Unterdrückung der Synthese von Akt durch die siRNAs stattgefunden hat. Dies konnte in der Western Blot Analyse belegt werden, indem das Akt-Signal in Akt-KD Zellen nicht restlos verschwunden war. Daher konnte die noch verbliebene Akt-Aktivität in dem Fall allerdings durch Perifosin inhibiert werden. Diese Resultate geben einen klaren Hinweis auf die Akt-abhängige Regulation von mTOR und p70/p85 S6K unter Hitzeschock-Bedingungen. In diesem experimentellen Ansatz wurde auch gezeigt, dass durch den Hitzeschock eine Hyperphosphorylierung der GSK α/β induziert wird. Die Erhöhung der Phosphorylierung von GSK3 α/β während einem 30-minütigen Hitzeschock zwischen 41-42°C wurde bereits beschrieben (Maroni et al., 2000). Diese verstärkte Phosphorylierung von GSK3 α/β könnte dadurch erklärt werden, dass die hitzeschockbedingte Induktion der Akt-Phosphorylierung in einer Phosphorylierung des Zielproteins GSK3 α/β resultiert. Die GSK3 α/β spielt in der Regulation des Zellmetabolismus eine führende Rolle und wird durch Akt inhibitorisch phosphoryliert. Diese Inhibierung resultiert neben anderen Prozessen in gesteigerten Glykogensynthese und Glykolyse (Manning und Cantley, 2007). Die Vermutung liegt nahe, dass unter einer Stresseinwirkung die Inhibition von GSK3 α/β sehr entscheidend für die Zellen ist, um die weitere Glykolyse zu gewährleisten und so dem

zellulären Stress Stand zu halten. Eine siRNA-vermittelte Akt-Unterdrückung oder Perifosinbehandlung zeigt jedoch eine unerwartete Auswirkung auf dieses Zielprotein von Akt. Erwartungsgemäß sollte die Behandlung der Zellen mit Akt-siRNAs und Perifosin eine Abnahme der phosphorylierten Form von GSK3 α/β bewirken. Überraschenderweise ergaben die Akt-siRNA-Experimente eine Zunahme der GSK3 α/β -Phosphorylierung wenn Akt unterdrückt war, auch bei der gleichzeitigen Gabe von Perifosin. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die kompensatorische Aktivierung eines anderen Signalweges, der die Phosphorylierung von GSK3 α/β unabhängig von Akt reguliert. So wurde beispielsweise Dvl (*Dishevelled-family protein*) als ein Faktor des Wnt-Signalweges beschrieben, der die GSK3 α/β inhibitorisch phosphoryliert (Logan und Nusse, 2004). Ein weiteres Molekül, 17 β -Estradiol, vermittelt eine Akt-unabhängige GSK3 α/β -Hyperphosphorylierung (Shi et al., 2008). Die GSK α/β ist in die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse involviert, unter anderem in die des programmierten Zelltodes (Woodget, 2001). Basierend hierauf lässt sich vermuten, dass die GSK α/β -Inhibierung durch einen derzeit unbekannten Regulationsmechanismus einen Beitrag zur Apoptoseinduktion der in SW872-Zellen leistet. So wurde beispielsweise auch in der Arbeit von Panka gezeigt, dass durch die GSK α/β -Inhibierung die Sorafenib-induzierte Apoptose deutlich verstärkt wird (Panka et al., 2007).

Die Akt-KD-Experimente in dieser vorliegenden Arbeit belegen weiterhin, dass die basale Expression und Hitzeschock-bedingte Induktion der HSP70-Expression bei Zellen mit unterdrücktem Akt im Vergleich zu Zellen mit intaktem Akt deutlich vermindert ist. In der Arbeit von Ying Qu wurde berichtet, dass die HSP70-Expression durch Akt reguliert wird und die Überexpression von Akt zu einer erhöhten Expression von HSP70 führt (Ying Qu et al., 2009). Die bisher publizierten Daten zur Interaktionen zwischen der HSP70-Expression und dem Pi3K-Akt-Signalweg deuten auf eine GSK3 β -abhängige negative Regulation des Hitzeschockfaktors 1 (HSF1) hin (He et al., 1998). Durch eine Phosphorylierung am Ser303 wird die Translokation von HSF1 in den Zellkern verhindert und somit wird auch die Induktion der Expression von HSP70 inhibiert (Mustafi et al., 2010). Somit sollte jede Aktivierung der Akt Kinase unter Hitzeschock-Bedingungen durch die inhibitorische Phosphorylierung von

GSK3 α/β , zur Expression bzw. Induktion der HSP70-Expression beitragen. In Gegenteil würde ein Verlust der Akt-Aktivität zur Reduktion der HSP70-Expression führen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Akt-KD zu einer erhöhten Phosphorylierung und somit zur Inhibierung von GSK3 α/β führt. Schlussfolgernd kann in den hier analysierten Akt-KD-Zellen eine GSK3 α/β -vermittelte, aber Akt-unabhängige Regulation der HSP70-Expression/Induktion stattfinden. In der Arbeit von Mustafi und Kollegen wurde gezeigt, dass die Hitzeschock-induzierte HSP70-Expression von der MAP Kinase p38 abhängig ist. Dieser Mechanismus wurde allerdings der Akt-Aktivierung durch p38 zugeschrieben (Mustafi et al., 2010). In den analysierten Zellen dieser Arbeit wurde der Phosphostatus der p38 MAP Kinase sowohl unter Hitzeschock- als auch Akt-KD-Bedingungen allerdings erhöht. Da der Ablauf der Phosphorylierungen von Kinasen und dadurch die Aktivierung von p38 ungeklärt bleibt, ist es schwierig nachzuvollziehen, dass die HSP70-Expression/Induktion auch über die p38 MAP Kinase reguliert wird. Andere Arbeiten berichten, dass auch die Erk1/2 MAP Kinasen eine inhibitorische Regulation auf HSF1 ausüben können (Wang et al., 2003). Die in dieser Arbeit durchgeführten Akt-KD/Hitzeschock-Experimente belegen eine Hochregulation der Phosphorylierungen von Erk1/2 MAP Kinasen während eines Hitzeschocks. Die HSP70-Expression wurde bei der hier eingesetzten Temperatur von 41,8°C dennoch induziert, sodass die Erk1/2-abhängige Hemmung der HSP70-Expression in SW872-Zellen ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse deuten drauf hin, dass die HSP70-Expression/Induktion sowohl Akt-abhängig als auch Akt-unabhängig reguliert werden kann. Allerdings blieb der genaue Mechanismus unbekannt. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass die Auswirkungen auf das Expressions-/Regulationsmuster der untersuchten Proteine, die sich durch einen Akt-KD ergeben haben, durch die Inkubation mit Perifosin weiterhin verstärkt wurden. Dieser Effekt ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass keine vollständige Akt-Unterdrückung stattgefunden hat und die restliche Aktivität dieser Kinase wurde durch seinen Inhibitor Perifosin unterbunden.

Anders zeigte sich das Expressions-/Induktionsmuster von HSP90 und HSP27 unter diesen Behandlungsbedingungen. Die HSP90-Induktion wurde durch einen

Hitzeschock initiiert, wobei – anders als bei HSP70 – weder ein Akt-KD noch die Perifosinbehandlung einen Effekt auf die hitzeinduzierte HSP90-Expression/Induktion zeigten. Eine Analyse der HSP27-Expression ergab, dass keine Induktion der Expression während der zweieinhalb-stündigen Hitzeexposition stattgefunden hat. Genauso hat der Akt-KD keinen Effekt auf die HSP27-Expression ausgeübt. Auch durch die zusätzliche Gabe von Perifosin konnten hier keine weiteren Effekte auf die Induktion bzw. Inhibition der HSP90- und HSP27-Expression festgestellt werden. HSP27 ist ein Komplexbindungspartner und ein Zielprotein von Akt (Phosphorylierung am Ser82). Diese Protein-Protein-Interaktionen werden unter einem Hitzeschock verstärkt gebildet, was die Funktion von HSP27 als Chaperon der anti-apoptotischen Signalmoleküle untermauert (Rane et al., 2003). Ausgehend von diesen Erkenntnissen kann vermutet werden, dass durch die fehlende kinetische Akt-Aktivität die Chaperon-Funktion von HSP27 negativ beeinflusst werden könnte. Demzufolge wäre die anti-apoptotische Funktion von HSP27 reduziert. Dies könnte auch zu der Apoptose-Induktion unter Akt-KD-Bedingungen beigetragen haben. Somit kann schlussgefolgert werden, dass Akt nicht in die Regulation von HSP-27-Expression involviert ist, sondern auf der post-transkriptionellen Ebene in der Regulation von HSP27 mitwirkt und somit eine weitere Funktion in der Stressantwort und dem Zellüberleben einnimmt.

Die anhand von Caspase-3 und PARP nachgewiesene Apoptoseinduktion in den SW872-Zellen unter Akt-KD-Bedingungen demonstriert die Schlüsselrolle von Akt in der Regulation der anti-apoptotischen Prozesse, und dies sowohl unter physiologischen als auch unter Hitzeschock-Bedingungen. Interessanterweise konnte in den hitzebehandelten Liposarkom SW872-Zellen eine Induktion der PARP-Expression detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Zelle nach einer zweieinhalb-stündigen Hitzeexposition als Antwort auf die möglicherweise entstandenen DNA-Schäden Reparaturmechanismen aktiviert. Hingegen hat in den Zellen, in denen Akt vor dem Hitzeschock unterdrückt worden war, keine PARP-Induktion, aber eine deutliche PARP-Fragmentierung stattgefunden. Ein wichtiger Punkt hierbei ist, dass die durch das Ausschalten des Akt-Proteins eingeleitete Aktivierung der Caspase-3 und die Fragmentierung von PARP durch die Ko-Inkubation mit Perifosin nicht weiter verstärkt wurden. Dies deutet auf eine Initiierung

der Apoptose durch die alleinige Akt-Unterdrückung hin. Eine zusätzliche unspezifische Akt-unabhängige pro-apoptotische Wirkung von Perifosin konnte in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden. Desweiteren konnte, die durch die Akt-Unterdrückung hochregulierte aktivierende Phosphorylierung der ERK1/2 MAP Kinasen das Zellüberleben nicht ausreichend unterstützen. Dieses Ergebnis demonstriert, dass Akt eine der übergeordneten Rollen bei der Regulation der wichtigen Überlebensmechanismen in Sarkomzellen einnimmt. Außerdem wurde in diesem Experiment eindeutig gezeigt, dass die Induktion der Phosphorylierungen von p38, ERK1/2 MAP Kinasen, GSK3 α/β , die Induktion der Apoptose, sowie die Unterdrückung von HSP70-Expression/Induktion alleine durch den Akt-KD veranlasst wurden. Dies deutet darauf hin, dass die ermittelte pro-apoptotische Wirkung von Perifosin auf die Inhibition der Akt-Aktivität zurückzuführen ist. Mögliche unspezifische Effekte von Perifosin, die zu den gleichen Auswirkungen führen könnten, sind aus diesem Grund zu vernachlässigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Akt eine hohe Relevanz in der Regulation der kinetischen Aktivität der nachfolgenden Proteine mTOR, p70/p85 S6K und der Expression/Induktion von HSP70 während der Hyperthermie hat. Dazu wurde in dieser Arbeit experimentell bekräftigt, dass Akt eine der übergeordneten Rollen in der Regulation der Mechanismen des Zellüberlebens und der Apoptose spielt. Dies erfolgt auch in dem Temperaturbereich, der im klinischen Einsatz während einer hyperthermischen Behandlung gezielt im Tumorgewebe erreicht wird. Außerdem zeigt diese Arbeit, dass Akt in die Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber Doxorubicin durch eine Induktion der PARP-Expression involviert ist. Akt repräsentiert daher ein wichtiges Zielprotein für pharmakologische Eingriffe, um die Effizienz verschiedener Therapien, vor allem der klinisch angewandten Thermo-Chemotherapie von Sarkomen, zu erhöhen. Die Anwendung von Akt-Inhibitoren als Zusatztherapeutika stellt daher eine neue vielversprechende Möglichkeit dar, um die Effektivität der Krebstherapien zu erhöhen und die Entstehung von Resistenzen gegenüber bereits angewandten Therapieverfahren zu minimieren.

7. Zusammenfassung

Sarkome stellen eine heterogene Gruppe von mesenchymalen Tumoren mit einem teilweise aggressiven klinischen Verlauf dar. Die biomedizinische Forschung untersucht molekulare Mechanismen, um durch eine gezielte Pharmaka-Modulierung die Effizienz klassischer Behandlungsmethoden zu steigern. Ein vielversprechendes therapeutisches Verfahren basiert auf der Anwendung der Hyperthermie in Kombination mit einer Standardchemotherapie. Die biologischen Auswirkungen der Hyperthermie auf intrazelluläre Prozesse, wie z.B. Signaltransduktionskaskaden, Reparaturmechanismen und Apoptosewege sind bislang nur teilweise erforscht.

In der Arbeit wurde die Auswirkung eines Hitzeschocks auf den anti-apoptotischen Akt-mTOR-Signaltransduktionsweg und dessen Bedeutung für die Vitalität der mit Hitze- oder Thermo-Chemotherapie behandelten Krebszellen *in vitro* untersucht.

Anhand der in unterschiedlichen Sarkomzelllinien durchgeführten Analysen konnte festgestellt werden, dass eine Hitzeexposition bei einer klinisch relevanten Temperatur von 41,8°C eine starke Phosphorylierung der Kinasen Akt, mTOR und p70/p85 S6K induziert. Die zeitgleich beobachtete Erhöhung der HSP70-Expression unter einem Hitzeschock deutet auf eine adäquate Antwort der Zellen auf Hitzeschock hin. Die Aktivierung des Akt-mTOR-Signalweges sowie die Induktion von HSP70 wirken anti-apoptotisch.

Eine Unterdrückung von PTEN und die resultierende Hyperaktivierung von Akt führten zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen. Durch die Hyperaktivierung von Akt konnte die Vitalität und Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nach einem Hitzeschock verbessert werden, was durch Perifosin wiederum unterdrückt werden konnte. Die Anwendung des Akt-Inhibitors Perifosin hat einen stark reduzierenden Effekt auf die konstitutive und Hitzeschock-bedingte Phosphorylierung der Akt-Kinase und ihrer *downstream targets*. So vermindert Perifosin die Vitalität und das klonogene Überleben von Sarkomzellen, die einem Hitzeschock ausgesetzt wurden.

Eine Analyse hinsichtlich des Akt-mTOR-Signalweges *in vitro* zeigt, dass auch Doxorubicin bei 37°C die Aktivierung der Signalkaskade auslöst. Zusätzlich wird durch Doxorubicin die PARP-Expression verstärkt. Die Kombinationsbehandlung von Sarkomzellen mit Doxorubicin und Perifosin zeigt einen reduzierenden Effekt auf die

Akt-Phosphorylierung, sowie die Induktion der PARP-Expression und sensitiviert die Sarkomzellen gegenüber einem Hitzeschock. Darüber hinaus konnte Perifosin die relative Resistenz den Osteosarkom MG63-Zellen und den Fibrosarkom HT1080-Zellen gegenüber Doxorubicin verringern.

In Akt-KD-Experimenten konnte dabei gezeigt werden, dass der Effekt von Perifosin spezifisch der Akt-Inhibition zugeschrieben werden kann. Sowohl ein Akt-KD als auch Perifosin führt zu einer Unterdrückung der Phosphorylierung von mTOR und p70/p85 S6K, zu einer Verminderung der Hitze-bedingten HSP70-Induktion und zur Induktion der Apoptose.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Akt eine wichtige Rolle in dem intrazellulären Schutzmechanismus und Überleben der dem Hitzeschock ausgesetzten Zellen spielt. Sie deuten auf eine wichtige Rolle des Akt-mTOR-Signalweges bezüglich der Überlebensfähigkeit der Zellen während eines Hitzeschocks hin.

8. Literaturverzeichnis

1. Actor B, Cobbers JM, Büschges R, Wolter M, Knobbe CB, Lichter P, Reifenberger G, Weber RG. Comprehensive analysis of genomic alterations in gliosarcoma and its two tissue components. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 Aug;34(4):416-27.
2. Agarwal A, Das K, Lerner N, Sathe S, Cicek M, Casey G, Sizemore N. The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin. *Oncogene*. 2005 Feb 3;24(6):1021-31.
3. Antonescu CR., The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. *Histopathology*. 2006 Jan;48(1):13-21.
4. Arcaro A, Guerreiro AS. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics*. 2007 Aug;8(5):271-306.
5. Bailey HH, Mahoney MR, Ettinger DS, Maples WJ, Fracasso PM, Traynor AM, Erlichman C, Okuno SH. Phase II study of daily oral perifosine in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2006 Nov 15;107(10):2462-7.
6. Balasubramanian L, Evens AM. Targeting angiogenesis for the treatment of sarcoma. *Curr Opin Oncol*. 2006 Jul;18(4):354-9.
7. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, Shah K, Socci ND, Weir BA, et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):715-21.
8. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39858-66. Epub 2002 Aug 9.
9. Behlke MA. *Mol Ther*. Progress towards in vivo use of siRNAs 2006 Apr;13(4):644-70. Epub 2006 Feb 14.
10. Berridge MV, Herst PM, Tan AS: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11:127-152 (2005).
11. Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell*. 2007 Apr;12(4):487-502.
12. Blitterswijk van WJ, Verheij M. Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des*. 2008;14(21):2061-74. Review.
13. Böcker W, et al. *Pathologie*. 4. Aufl. Elsevier, Amsterdam 2008
14. Bokemeyer C, "Onkologisch, Weichteilsarkome", Springer, 3/2006
15. Bozulic L, Hemmings BA. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Apr;21(2):256-61. Epub 2009 Mar 19.
16. Brognard J, Sierrecki E, Gao T, Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*. 2007 Mar 23;25(6):917-31.

17. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999 Mar 19;96(6):857-68.
18. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998 Nov 13;282(5392):1318-21.
19. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):439-44. Epub 2007 Jul 4.
20. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-50. Review.
21. Chiarini F, Del Sole M, Mongiorgi S, Gaboardi GC, Cappellini A, Mantovani I, Follo MY, McCubrey JA, Martelli AM. The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia*. 2008 Jun;22(6):1106-16. Epub 2008 Apr 3.
22. Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005 Summer;10(2):86-103.
23. Cipak L, Jantova S. PARP-1 inhibitors: a novel genetically specific agents for cancer therapy. *Neoplasma*. 2010;57(5):401-5. Review.
24. Clark CB, Rane MJ, El Mehdi D, Miller CJ, Sachleben LR Jr, Gozal E. Role of oxidative stress in geldanamycin-induced cytotoxicity and disruption of Hsp90 signaling complex. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 15;47(10):1440-9. Epub 2009 Aug 21.
25. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*. 2003 Feb;13(2):65-70.
26. Crazzolara R, Bradstock KF, Bendall LJ. RAD001 (Everolimus) induces autophagy in acute lymphoblastic leukemia. *Autophagy*. 2009 Jul;5(5):727-8. Epub 2009 Jul 23.
27. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.
28. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):231-41.
29. Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, Lazar AJ, Gershenwald JE, Mills GB. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer*. 2008 Oct 21;99(8):1265-8. Epub 2008 Sep 23.
30. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*. 1998 Nov 15;12(22):3499-511.
31. Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, Thomas NS, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine

- withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol.* 2002 Feb 4;156(3):531-42. Epub 2002 Jan 28.
32. Dobashi Y, Suzuki S, Sato E, Hamada Y, Yanagawa T, Ooi A., EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. *Mod Pathol* 22, 2009
 33. Dominska M, Dykxhoorn DM. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. *J Cell Sci.* 2010 Apr 15;123(Pt 8):1183-9.
 34. Downes CP, Perera N, Ross S, Leslie NR. Substrate specificity and acute regulation of the tumour suppressor phosphatase, PTEN. *Biochem Soc Symp.* 2007;(74):69-80.
 35. Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal.* 2009 Jun;21(6):827-35. Epub 2009 Jan 8.
 36. Engel JB, Schönhals T, Häusler S, Krockenberger M, Schmidt M, Horn E, Köster F, Dietl J, Wischhusen J, Honig A. Induction of programmed cell death by inhibition of AKT with the alkylphosphocholine perifosine in in vitro models of platinum sensitive and resistant ovarian cancers. *Arch Gynecol Obstet.* 2011 Mar;283(3):603-10. Epub 2010 Apr 20.
 37. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006 Aug;7(8):606-19. Review.
 38. Fei HR, Chen G, Wang JM, Wang FZ. Perifosine induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines by blockade of Akt phosphorylation. *Cytotechnology.* 2010 Oct;62(5):449-60. Epub 2010 Sep 15.
 39. Fletcher CD, The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification. *Histopathology.* 2006 Jan;48(1):3-12.
 40. Fourre N, Millerot-Serruot E, Garnotel R, Zahm JM, Bonnet N, Millot JM, Jeannesson P. Extracellular matrix proteins protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin. *Cancer Sci.* 2008 Aug; 99(8):1699-705.
 41. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene.* 2008 Oct 27;27(50):6473-88.
 42. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315-9.
 43. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R, Whale AD, Martinez-Diaz H, Rozengurt N, Cardiff RD, Liu X, Wu H. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell.* 2003 Feb;3(2):117-30.
 44. Friedrichs N, Trautmann M, Endl E, Sievers E, Kindler D, Wurst P, Czerwitski J, Steiner S, Renner M, Penzel R, Koch A, Larsson O, Tanaka S, Kawai A, Schirmacher P, Mechtersheimer G, Wardelmann E, Buettner R, Hartmann W., Phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in synovial sarcoma. *Int J Cancer.* 2011 Oct 1;129(7):1564-75.
 45. Fu L, Kim YA, Wang X, Wu X, Yue P, Lonial S, Khuri FR, Sun SY. Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy. *Cancer Res.* 2009 Dec 1;69(23):8967-76. Epub 2009 Nov 17.

46. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet JG, Soussi T, Polla BS., Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer*. 1994;30A(12):1884-91.
47. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*. 2005 Apr 1;18(1):13-24.
48. Gills JJ, Dennis PA. Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr Oncol Rep*. 2009 Mar;11(2):102-10.
49. Grimer R, Judson I, Peake D, Seddon B, Guidelines for the management of soft tissue sarcomas. *Sarcoma*. 2010;2010:506182. Epub 2010 May 31.
50. Grivicich I, Regner A, Zanoni C, Correa LP, Jotz GP, Henriques JA, Schwartzmann G, da Rocha AB. Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Oct;22(10):1201-8. Epub 2007 Mar 28.
51. Hadchity E, Aloy MT, Paulin C, Armandy E, Watkin E, Rousson R, Gleave M, Chapet O, Rodriguez-Lafrasse C. Heat shock protein 27 as a new therapeutic target for radiation sensitization of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther*. 2009 Aug;17(8):1387-94. Epub 2009 May 12.
52. Han S, Ritzenthaler JD, Zheng Y, Roman J. PPARbeta/delta agonist stimulates human lung carcinoma cell growth through inhibition of PTEN expression: the involvement of PI3K and NF-kappaB signals. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Jun;294(6):L1238-49. Epub 2008 Apr 4.
53. Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 11;1697(1-2):3-16.
54. Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. Review.
55. Hande KR., Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Oct 1;1400(1-3):173-84.
56. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T, Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res*. 2000 Nov 1;60(21):5988-94.
57. He B, Meng YH, Mivechi NF. Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. *Mol Cell Biol*. 1998 Nov;18(11):6624-33.
58. Heijden van der M, Versteilen AM, Sipkema P, van Nieuw Amerongen GP, Musters RJ, Groeneveld AB. Rho-kinase-dependent F-actin rearrangement is involved in the inhibition of PI3-kinase/Akt during ischemia-reperfusion-induced endothelial cell apoptosis. *Apoptosis*. 2008 Mar;13(3):404-12.
59. Helman LJ, Meltzer P, Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer*. 2003 Sep;3(9):685-94.
60. Henke, D., Doxorubicinhydrochlorid, in *Kommentar zum DAB*. 1993: S. 1-6.
61. Hennessy BT, Lu Y, Poradosu E, Yu Q, Yu S, Hall H, Carey MS, Ravoori M, Gonzalez-Angulo AM, Birch R, Henderson IC, Kundra V, Mills GB. 15;13(24):7421-31. Pharmacodynamic markers of perifosine efficacy. *Clin Cancer Res*. 2007 Dec.

62. Hergovich A, Stegert MR, Schmitz D, Hemmings BA. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Apr;7(4):253-64.
63. Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, Socci ND, Behrendt N, Ma L, Maki RG, Pandolfi PP, Cordon-Cardo C., The Akt/mTor pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nature Med* 12, 2007
64. Hideshima T, Catley L, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Tai YT, Vallet S, Kiziltepe T, Ocio E, Ikeda H, Okawa Y, Hideshima H, Munshi NC, Yasui H, Richardson PG, Anderson KC. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* 2007 Sep;138(6):783-91.
65. Hildebrandt B, Rau B, Gellermann J, Kerner T, Nicolaou A, Blohmer E-U, Trappe RU, Riess H und Wust P, Lokoregionäre Hyperthermie: Standards und neue Entwicklungen, Springer-Verlag 2004, Wien Med Wochenschr (2004) 154/7–8: 148–158.
66. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002 Jul;43(1):33-56.
67. Hooshmand-Rad R, Claesson-Welsh L, Wennström S, Yokote K, Siegbahn A, Heldin CH. Involvement of phosphatidylinositide 3'-kinase and Rac in platelet-derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis. *Exp Cell Res.* 1997 Aug 1;234(2):434-41.
68. Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans.* 2009 Feb;37(Pt 1):217-22.
69. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):648-57.
70. Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner CM, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch KW, Dürr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay JY, Hohenberger P; Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):561-70. Epub 2010 Apr 29.
71. Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2008 Nov;44(17):2546-54. Epub 2008 Sep 11.
72. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1122-8. Epub 2004 Oct 3.
73. Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010 Apr 23;3(4):416-28. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. Review.
74. Jendrossek V, Müller I, Eibl H, Belka C. Intracellular mediators of erucylphosphocholine-induced apoptosis. *Oncogene.* 2003 May 1;22(17):2621-31.
75. Jolesch A, Elmer K, Bendz H, Issels RD, Noessner EH. Sp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur J Cell Biol.* 2011 Mar 30.
76. Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Oct 4;92(19):1564-72.

77. Kakigi R, Naito H, Ogura Y, Kobayashi H, Saga N, Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Katamoto S. Heat stress enhances mTOR signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol Sci*. 2011 Mar;61(2):131-40. Epub 2011 Jan 11.
78. Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*. 1997 Dec 11;390(6660):632-6.
79. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239_257.
80. Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J*. 2001 Sep;15(11):1953-62.
81. Kim S, Domon-Dell C, Kang J, Chung DH, Freund JN, Evers BM. Down-regulation of the tumor suppressor PTEN by the tumor necrosis factor-alpha/nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-inducing kinase/NF-kappaB pathway is linked to a default IkappaB-alpha autoregulatory loop. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4285-91. Epub 2003 Nov 17.
82. Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene*. 2003 May 22;22(21):3205-12.
83. Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther*. 2003 Nov;2(11):1093-103.
84. Konishi H, Fujiyoshi T, Fukui Y, Matsuzaki H, Yamamoto T, Ono Y, Andjelkovic M, Hemmings BA, Kikkawa U. Activation of protein kinase B induced by H₂O₂ and heat shock through distinct mechanisms dependent and independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biochem*. 1999 Dec;126(6):1136-43.
85. Krawczyk PM, Eppink B, Essers J, Stap J, Rodermond H, Odijk H, Zelensky A, van Bree C, Stalpers LJ, Buist MR, Soullié T, Rens J, Verhagen HJ, O'Connor MJ, Franken NA, Ten Hagen TL, Kanaar R, Aten JA. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 14;108(24):9851-6. Epub 2011 May 9.
86. Kumar A, Fillmore HL, Kadian R, Broaddus WC, Tye GW, Van Meter TE. The alkylphospholipid perifosine induces apoptosis and p21-mediated cell cycle arrest in medulloblastoma. *Mol Cancer Res*. 2009 Nov;7(11):1813-21. Epub 2009 Nov 3.
87. Kwon J, Lee SR, Yang KS, Ahn Y, Kim YJ, Stadtman ER, Rhee SG. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 23;101(47):16419-24. Epub 2004 Nov 8.
88. Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*. 2000 Aug 15;350 Pt 1:1-18.
89. Lessnick SL, Kovar H, Houghton P. The molecular basis of sarcoma. *Sarcoma*. 2011;2011:864130. Epub 2011 Jun 7.

90. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.
91. Li X, Luwor R, Lu Y, Liang K, Fan Z. Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/C225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. *Oncogene*. 2006 Jan 26;25(4):525-35.
92. Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, Tang L, Hla T, Zeng R, Li L, Wu D. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol*. 2005 Apr;7(4):399-404. Epub 2005 Mar 27. Erratum in: *Nat Cell Biol*. 2005 May; 7(5):531. Dong, Xiemei [corrected to Dong, Xuemei]. *Nat Cell Biol*. 2006 Sep;8(9):1038.
93. Li Z, Tan F, Liewehr DJ, Steinberg SM, Thiele CJ. In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Jun 2;102(11):758-70. Epub 2010 May 12.
94. Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003 Jul-Aug;2(4):339-45.
95. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*. 2002 Oct;8(10):1153-60. Epub 2002 Sep 16.
96. Lindner LH, Issels RD. Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2011 Mar;12(1):12-20. Review.
97. List K, Szabo R, Molinolo A, Sriuranpong V, Redeye V, Murdock T, Burke B, Nielsen BS, Gutkind JS, Bugge TH. Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. *Genes Dev*. 2005 Aug 15;19(16):1934-50.
98. Logan CY, Nusse R. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810. The Wnt signaling pathway in development and disease.
99. Lo Piccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*. 2008 Feb-Apr;11(1-2):32-50. Epub 2007 Dec 31. Review.
100. Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*. 1998 Feb;18(2):753-61.
101. Lüpertz R, Wätjen W, Kahl R, Chovolou Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*. 2010; 271:115-21
102. Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, Liu LF. Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8839-46.
103. Ma N, Szmitko P, Brade A, Chu I, Lo A, Woodgett J, Klamut H, Liu FF. Kinase-dead PKB gene therapy combined with hyperthermia for human breast cancer. *Cancer Gene Ther*. 2004 Jan;11(1):52-60.
104. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 May;10(5):307-18. Epub 2009 Apr 2.

105. Maira, Di G, Brustolon F, Pinna LA, Ruzzene M. Dephosphorylation and inactivation of Akt/PKB is counteracted by protein kinase CK2 in HEK 293T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Oct;66(20):3363-73. Epub 2009 Aug 8.
106. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg NmTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene.* 2006 Oct 16;25(48):6416-22.
107. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1261-74.
108. Maroni P, Bendinelli P, Tiberio L, Rovetta F, Piccoletti R, Schiaffonati L. In vivo heat-shock response in the brain: signalling pathway and transcription factor activation. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Nov 6;119(1):90-9.
109. Maroni P, Bendinelli P, Zuccorononno C, Schiaffonati L, Piccoletti R. Cellular signalling after in vivo heat shock in the liver. *Cell Biol Int.* 2000;24(3):145-52.
110. Matsuzaki H, Yamamoto T, Kikkawa U. Distinct activation mechanisms of protein kinase B by growth-factor stimulation and heat-shock treatment. *Biochemistry.* 2004 Apr 13;43(14):4284-93.
111. Mearow KM, Dodge ME, Rahimtula M, Yegappan C. Stress-mediated signaling in PC12 cells - the role of the small heat shock protein, Hsp27, and Akt in protecting cells from heat stress and nerve growth factor withdrawal. *J Neurochem.* 2002 Oct;83(2):452-62.
112. Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal.* 2009 May;21(5):656-64. Epub 2009 Jan 7.
113. Milani V, Noessner E, Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2006 Mar;55(3):312-9. Epub 2005 Sep 3.
114. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, Yang Z. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2002 Dec;22(24):8467-77.
115. Moon B, Duddy N, Ragolia L, Begum N. Stimulation of glycogen synthesis by heat shock in L6 skeletal-muscle cells: regulatory role of site-specific phosphorylation of glycogen-associated protein phosphatase 1. *Biochem J.* 2003 May 1;371(Pt 3):857-66.
116. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Emlet DR, Montgomery RB, Wong AJ. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1998 Jan 2;273(1):200-6.
117. Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Aguilar-Quesada R, Cañuelo A, Nuñez MI, Valenzuela MT, Ruiz de Almodóvar JM, de Murcia G, F. Javier Oliver, 1 PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J.* 2005 February 15; 386(Pt 1): 119–125.
118. Mustafi BS, Chakraborty PK, Raha S. Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70. *PLoS One.* 2010 Jan 14;5(1):e8719.
119. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):9052-7.
120. Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kozawa O, Moriwaki H. Rho-kinase regulates negatively the epidermal growth factor-stimulated colon cancer cell proliferation. *Int J Oncol.* 2010 Mar;36(3):585-92.

121. Neri LM, Borgatti P, Tazzari PL, Bortul R, Cappellini A, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, Martelli AM. The phosphoinositide 3-kinase/AKT1 pathway involvement in drug and all-trans-retinoic acid resistance of leukemia cells. *Mol Cancer Res.* 2003 Jan;1(3):234-46.
122. Ng SSW, Tsao MS, Chow S, Hedley DW. Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2000 Oct 1;60(19):5451-5.
123. Nosedá A, White JG, Godwin PL, Jerome WG, Modest EJ. Membrane damage in leukemic cells induced by ether and ester lipids: an electron microscopic study. *Exp Mol Pathol.* 1989 Feb;50(1):69-83.
124. Nyåker M, Cappellini A, Mantovani I, Martelli AM. Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol Cancer Ther.* 2006 Jun;5(6):1559-70.
125. Obata T, Yaffe MB, Leparo GG, Piro ET, Maegawa H, Kashiwagi A, Kikkawa R, Cantley LC. Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J Biol Chem.* 2000 Nov 17;275(46):36108-15.
126. Oliver FJ, Ménissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* 1999 Aug 16;18(16):4446-54.
127. Pal Sumanta Kumar, Karen Reckamp, Hua Yu, Robert A. Figlin. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer *Expert Opin Investig Drugs.* 2010 November; 19(11): 1355–1366.
128. Panka DJ, Cho DC, Atkins MB, Mier JW. GSK-3beta inhibition enhances sorafenib-induced apoptosis in melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 2008 Jan 11;283(2):726-32. Epub 2007 Nov 8.
129. Parcellier A, Tintignac LA, Zhuravleva E, Hemmings BA. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal.* 2008 Jan;20(1):21-30. Epub 2007 Jul 25.
130. Patel V, Lahusen T, Sy T, Sausville EA, Gutkind JS, Senderowicz AM. Perifosine, a novel alkylphospholipid, induces p21(WAF1) expression in squamous carcinoma cells through a p53-independent pathway, leading to loss in cyclin-dependent kinase activity and cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2002 Mar 1;62(5):1401-9.
131. Pez F, Dayan F, Durivault J, Kaniewski B, Aimond G, Le Provost GS, Deux B, Clézardin P, Sommer P, Pouyssegur J, Reynaud C. The HIF-1-inducible lysyl oxidase activates HIF-1 via the Akt pathway in a positive regulation loop and synergizes with HIF-1 in promoting tumor cell growth. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):1647-57. Epub 2011 Jan 14.
132. Pham FH, Sugden PH, Clerk A. Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2000 Jun 23; 86(12):1252-8.
133. Polier S, Dragovic Z, Hartl FU, Bracher A. Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell.* 2008 Jun 13; 133(6):1068-79.
134. Ponder BA, Molecular genetics of cancer. *BMJ.* 1992 May 9; 304(6836):1234-6.

135. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell*. 2008 Sep 9;14(3):250-62.
136. Price BD, Youmell MB. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res*. 1996 Jan 15;56(2):246-50.
137. Qu Y, Wang J, Sim MS, Liu B, Giuliano A, Barsoum J, Cui X. Elesclomol, counteracted by Akt survival signaling, enhances the apoptotic effect of chemotherapy drugs in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jun;121(2):311-21. Epub 2009 Jul 16.
138. Raaphorst GP, Maude-Leblanc J, Li L. Evaluation of recombination repair pathways in thermal radiosensitization. *Radiat Res*. 2004 Feb;161(2):215-8.
139. Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25;278(30):27828-35. Epub 2003 May 9.
140. Richardson P, Lonial S, Jakubowiak A, Krishnan A, Wolf J, Densmore J, et al. Multi-Center Phase II Study of Perifosine (KRX-0401) Alone and in Combination with Dexamethasone (dex) for Patients with Relapsed or Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (MM): Promising Activity as Combination Therapy with Manageable Toxicity. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2007. November 16. 110(11):1164. 2007.
141. Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*. 1999 Sep 2;401(6748):86-90.
142. Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nuñez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ. Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*. 1999 Nov 26;286(5445):1738-41.
143. Ruiter GA, Verheij M, Zerp SF, van Blitterswijk WJ. Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Feb 1;49(2):415-9.
144. Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res*. 1999 May 15;59(10):2457-63.
145. Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs*. 2003 Feb;14(2):167-73.
146. Sakamoto A, Iwamoto Y. Current status and perspectives regarding the treatment of osteo-sarcoma: chemotherapy. *Rev Recent Clin Trials*. 2008 Sep;3(3):228-31.
147. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.
148. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 26;97(20):10832-7.
149. Scheid MP, Woodgett JR. Phosphatidylinositol 3' kinase signaling in mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001 Jan;6(1):83-99.
150. Schlemmer M, Lindner LH, Issels RD. *Hyperthermie Die Onkologie* (Hiddemann W, Huber H, Bartram CR, eds.). Springer Verlag, Berlin. 2004; 1. Auflage, 5-15.

151. Schöffski P, Taron M, Jimeno J, Grosso F, Sanfilipio R, Casali PG, Le Cesne A, Jones RL, Blay JY, Poveda A, Maki RG, Nieto A, Tercero JC, Rosell R. Predictive impact of DNA repair functionality on clinical outcome of advanced sarcoma patients treated with trabectedin: a retrospective multicentric study. *Eur J Cancer*. 2011 May;47(7):1006-12. Epub 2011 Mar 4.
152. Scotlandi K, Picci P. Targeting insulin-like growth factor 1 receptor in sarcomas. *Curr Opin Oncol*. 2008 Jul;20(4):419-27.
153. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*. 2000 Oct 1;14(19):2501-14.
154. Sekulić A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, Abraham RT. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res*. 2000 Jul 1;60(13):3504-13.
155. Shaw M, Cohen P, Alessi DR. The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J*. 1998 Nov 15; 336 (Pt 1):241-6.
156. Shi HR, Zhu LQ, Wang SH, Liu XA, Tian Q, Zhang Q, Wang Q, Wang JZ. 17beta-estradiol attenuates glycogen synthase kinase-3beta activation and tau hyperphosphorylation in Akt-independent manner. *J Neural Transm*. 2008 Jun;115(6):879-88. Epub 2008 Jan 24.
157. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*. 2002 Oct;8(10):1145-52. Epub 2002 Sep 16.
158. Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):29-41.
159. Sliva D, Rizzo MT, English D. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*. 2002 Feb 1;277(5):3150-7. Epub 2001 Oct 31.
160. Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, Dunlop EA, Ekim B, Maj NE, Tee AR, Fingar DC. mTOR Ser-2481 autophosphorylation monitors mTORC-specific catalytic activity and clarifies rapamycin mechanism of action. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12;285(11):7866-79. Epub 2009 Dec 18.
161. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*. 1997 Apr;15(4):356-62.
162. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Bäsecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, McCubrey JA. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to

- therapy-implications for cancer and aging. *Aging* (Albany NY). 2011 Mar;3(3):192-222.
163. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004 Feb;18(2):189-218.
 164. Steinert D, Henderson C, Chawla S, Staddon A, Schuetze S, Ryan C. A Phase II Trial of perifosine in patients with chemo-insensitive sarcomas: preliminary results. A Sarcoma Alliance for Research through collaboration (SARC) study. *Connective Tissue Oncology Society (CTOS)* 2007.
 165. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*. 1998 Jan 30;279(5351):710-4.
 166. Stingl L, Stühmer T, Chatterjee M, Jensen MR, Flentje M, Djuzenova CS. Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitize tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction. *Br J Cancer*. 2010 May 25;102(11):1578-91.
 167. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 1997 Jul 25;277(5325):567-70.
 168. Teng HW, Wang HW, Chen WM, Chao TC, Hsieh YY, Hsieh CH, Tzeng CH, Chen PC, Yen CC. Prevalence and prognostic influence of genomic changes of EGFR pathway markers in synovial sarcoma. *J Surg Oncol*. 2011 Jun;103(8):773-81.
 169. Thews G, Mutschler E, Vaupel P, 5. Aufl. 1999.
 170. Ueda H, Morishita R, Narumiya S, Kato K, Asano T. Galphag11 signaling induces apoptosis through two pathways involving reduction of Akt phosphorylation and activation of RhoA in HeLa cells. *Exp Cell Res*. 2004 Aug 1; 298(1):207-17.
 171. Urano M, Begley J, Reynolds R. Interaction between adriamycin cytotoxicity and hyperthermia: growth-phase-dependent thermal sensitization. *Int J Hyperthermia*. 1994 Nov-Dec;10(6):817-26.
 172. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000 Mar 15;346 Pt 3:561-76.
 173. Vasudevan KM, Gurumurthy S, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb;24(3):1007-21.
 174. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tschlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med*. 2002 Oct;8(10):1136-44. Epub 2002 Sep 16.
 175. Vink SR, Lagerwerf S, Mesman E, Schellens JH, Begg AC, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Radiosensitization of squamous cell carcinoma by the alkylphospholipid perifosine in cell culture and xenografts. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1615-22

176. Vogelzang NJ, Hutson TE, Samlowski W, Somer B, Richey S, Alemany C, et al. Phase II study of perifosine in metastatic renal cell carcinoma (RCC) progressing after prior therapy (Rx) with a VEGF receptor inhibitor. *J Clin Oncol* (Meeting Abstracts). 2009 May 20;27(15S):5034. 2009.
177. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. 2007 Mar 22;26(13):1932-40.
178. Wang X, Grammatikakis N, Siganou A, Calderwood SK. Regulation of molecular chaperone gene transcription involves the serine phosphorylation, 14-3-3 epsilon binding, and cytoplasmic sequestration of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(17):6013-26.
179. Wang X, Shi Y, Wang J, Huang G, Jiang X. Crucial role of the C-terminus of PTEN in antagonizing NEDD4-1-mediated PTEN ubiquitination and degradation. *Biochem J*. 2008 Sep 1;414(2):221-9.
180. West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat*. 2002 Dec;5(6):234-48.
181. Westfall SD, Skinner MK. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and allows adjunct chemotherapy treatment. *Mol Cancer Ther*. 2005 Nov;4(11):1764-71.
182. Woodgett JR. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE*. 2001 Sep 18; 2001(100):re12.
183. Woodgett JR. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Apr; 17(2):150-7.
184. www.merck-chemicals.com
185. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):471-84. Review.
186. Zhang H, Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med (Berl)*. 2004 Aug;82(8):488-99. Epub 2004 May 27.
187. Zhang S, Yu D. PI(3)kinase apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Sep 1;16(17):4325-30. Epub 2010 Jul 8.
188. Zwelling LA, Slovak ML, Doroshow JH, Hinds M, Chan D, Parker E, Mayes J, Sie KL, Meltzer PS, Trent JM. HT1080/DR4: P-glycoprotein-negative human fibrosarcoma cell line exhibiting resistance to topoisomerase II-reactive drugs despite the presence of a drug-sensitive topoisomerase II. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Oct 3;82(19):1553-6.

